



**HAL**  
open science

# Impact des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur le métabolisme lipidique et le transport du phosphore chez le champignon mycorhizien à arbuscules

## **Rhizophagus irregularis**

Maryline Calonne

### ► To cite this version:

Maryline Calonne. Impact des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur le métabolisme lipidique et le transport du phosphore chez le champignon mycorhizien à arbuscules *Rhizophagus irregularis*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université du Littoral Côte d'Opale, 2012. Français. NNT : 2012DUNK0311 . tel-01333596

**HAL Id: tel-01333596**

**<https://theses.hal.science/tel-01333596v1>**

Submitted on 17 Jun 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE DE L'UNIVERSITE DU LITTORAL COTE D'OPALE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Ecole Doctorale des Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement  
Ingénierie des Fonctions Biologiques  
Mention: Physiologie végétale

par

**Maryline CALONNE**

**Impact des hydrocarbures aromatiques polycycliques  
sur le métabolisme lipidique et le transport du phosphore  
chez le champignon mycorhizien à arbuscules *Rhizophagus irregularis***

Soutenue le 4 décembre 2012 devant la commission d'examen :

Rapporteurs : **WIPF D.**, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon, France  
**CUNY D.**, Professeur, Université Lille 2 Droit et Santé, Lille, France

Examineur : **BUEE M.**, Chargé de recherche, Université de Lorraine, Nancy, France

Directrices de thèse : **LOUNES-HADJ SAHRAOUI A.**, Maître de conférences-HDR, ULCO, France  
**GRANDMOUGIN-FERJANI A.**, Professeur, ULCO, France

***Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV), Calais  
50, rue Ferdinand Buisson, BP 669 - 62228 Calais cedex***



# Remerciements

---

Tous mes remerciements à Monsieur **Pirouz Shirali**, Directeur actuel de l'UCEIV, pour ses encouragements constants, sa confiance et son oreille attentive pour le bien-être des étudiants.

Cette thèse n'aurait jamais débuté et abouti sans Madame **Anissa Lounès-Hadj Sahraoui**, Maître de conférences-HDR à l'ULCO et directrice de cette thèse. Je vous adresse mes remerciements les plus sincères et les plus respectueux. A chaque instant, depuis mon M2, votre investissement dans le travail réalisé m'a vraiment été très précieux. Vous avez su me conseiller et me guider tout en me laissant une grande part de liberté et de responsabilités. J'apprécie votre rigueur, vos connaissances scientifiques, votre précision et votre justesse. J'apprécie également vos qualités humaines, votre impartialité, votre patience et vos conseils précieux. J'ai muri et progressé grâce à vous.

Je remercie également Madame **Anne Grandmougin-Ferjani**, Professeur à l'ULCO et co-directrice de cette thèse, pour m'avoir proposé d'effectuer mon stage de M1 à l'UCEIV il y a 5 ans. Grâce à ce premier stage, j'ai découvert le domaine passionnant de la Recherche et surtout j'ai découvert le monde « merveilleux » des champignons mycorhiziens à arbuscules. Je la remercie également pour les conseils lors de la rédaction de cette thèse.

Un merci également à Monsieur **Joël Fontaine**, Maître de conférences-HDR à l'ULCO, pour ses conseils lors de mon initiation aux expériences de radio-marquage, d'extraction des lipides, pour la rédaction de la thèse et pour son encadrement rigoureux lors de mes stages en M1 et M2, je lui doit beaucoup également.

Je remercie également Monsieur **Daniel Wipf**, Professeur à l'Université de Bourgogne et Monsieur **Damien Cuny**, Professeur à l'Université Lille 2 Droit et Santé, d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Que Monsieur **Marc Buée**, Chargé de Recherche à l'Université de Lorraine, trouve ici toute ma reconnaissance pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je voudrais également remercier le **Syndicat Mixte de la Côte d'Opale (SMCO)** pour m'avoir octroyé la bourse de thèse et l'**Institut de Recherche en ENvironnement Industriel (IRENI)**, pour avoir contribué à financer ces travaux de recherche.

A Monsieur **Benoît Tisserand**, Ingénieur de Recherche à l'UCEIV-Calais, pour l'initiation aux techniques de la biologie moléculaire, **Frédéric Laruelle**, Ingénieur de Recherche à l'UCEIV-Calais pour son aide et ses conseils, notamment lors des analyses en GC et en HPLC et Madame **Natacha Bourdon**, Technicienne à l'UCEIV-Calais, pour son aide et sa disponibilité, à chaque fois que la GC ou l'HPLC sont en panne.

Je tiens à remercier Monsieur **Stéphane Declerck**, Professeur à l'Université Catholique de Louvain-la-Neuve, en Belgique, Directeur de l'Unité de Microbiologie: de m'avoir accueilli au sein de son équipe pour l'expérience de transport du Phosphore et pour les cultures in



vitro de plantes entières. Je remercie également Monsieur **Hervé Dupré de Boulois**, Docteur à l'Université Catholique de Louvain-la-Neuve, pour la réalisation de cette expérience.

Je voudrais remercier toutes les doctorantes de l'UCEIV-Calais, juste pour être là... Elles sont toutes devenues de véritables amies, j'espère que cette complicité qui règne au sein des étudiantes continuera toujours. Je nommerais **Ingrid, Ghalia, Sonia, Christine, Maréva, Léa et Estelle** (qui m'a initié au monde des mycorhizes et de l'extraction des lipides)...  
...sans oublier **Djouher**, ma copine du Canada et mon petit « neveu » **Aksel**. Je la remercie pour tout, j'espère la revoir bientôt...

J'adresse également mes remerciements à tous les membres de l'UCEIV-Calais pour les bons moments passés en votre compagnie. Je citerais **Corinne, Sandrine, Béatrice, Philippe, Jovana et Zhang**. Mes pensées à tous les membres de l'UCEIV-Dunkerque.

Dans cette version définitive, je voudrais remercier ceux qui m'ont soutenu pendant ces années, qui étaient là quand j'en avais besoin :

A mes parents, **René** et **Brigitte**, qui m'ont toujours soutenu, qui ont toujours su que j'irai loin. J'espère que vous êtes fier du travail que vous avez accompli durant ces 26 années passées à essayer de m'éduquer! Il y a trop de choses que je voudrais vous dire, je résumerais donc à: vous êtes mes modèles et je vous admire.

A ma grande sœur **Blandine, André, Ophélie et Antoine**, qui m'ont soutenu de loin, je vous remercie pour tout et je vais venir vous voir plus souvent, promis!

A **Paul** et **Sonia**, ma famille. De même, je ne pourrais jamais assez vous remercier pour tout ce que vous fait pour moi. Je n'en serais peut-être pas là non plus si vous n'aviez pas accepté de m'accueillir à Coquelles il y a 8 ans maintenant.

A ma (future) belle-famille, je vous remercie de votre bonne humeur, du temps que l'on passe ensemble, de votre soutien et pour beaucoup d'autres choses...

**Nicolas**, mes remerciements à ton égard seraient trop long sur le papier, je condense également: merci de ta patience et pour m'avoir soutenu tout le long de ma thèse, je sais que ça n'a pas été toujours facile pour toi. Nos efforts payeront bientôt, je t'en fais la promesse.

Une pensée profonde et spirituelle pour **Gabrielle**...

# Sommaire

---

Liste des abréviations	i
Liste des figures	ii
Liste des photos	iii
Liste des tableaux	iv
<b>Introduction générale - Objectifs</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I. Synthèse bibliographique</b>	
<b>Partie 1. Les champignons mycorhiziens à arbuscules</b>	<b>7</b>
<b>I. Les différents types de mycorhizes</b>	<b>9</b>
<u>I.1. Les ectomycorhizes</u>	9
<u>I.2. Les ectendomycorhizes</u>	9
<u>I.3. Les endomycorhizes</u>	10
I.3.1. Cycle de développement des CMA	13
I.3.2. La phase asymbiotique	14
I.3.3. La phase symbiotique	24
<b>II. Impact des polluants sur les principaux stades de développement des CMA</b>	<b>28</b>
<b>Partie 2. Bénéfices de la symbiose mycorhizienne à arbuscules</b>	<b>32</b>
<b>I. Bénéfices apportés par le CMA</b>	<b>33</b>
<b>II. Bénéfices apportés à la plante</b>	<b>34</b>
<u>II.1. Transfert du Phosphore (P) du CMA à la plante</u>	35
<u>II.2. Transfert de l'azote (N) du CMA à la plante</u>	40
<u>II.3. Transfert d'oligo-éléments du CMA à la plante</u>	42
<u>II.4. Autres bénéfices apportés aux plantes par la colonisation mycorhizienne arbusculaire</u>	42
II.4.1. Effet sur la structure du sol	42
II.4.2. Résistance aux stress biotiques	43
II.4.3. Résistance aux stress abiotiques	45
<b>Partie 3. Le métabolisme lipidique des CMA</b>	<b>52</b>
<b>I. Structure, composition et teneur des lipides des CMA</b>	<b>52</b>
<u>I.1. Les stérols</u>	54

<u>I.2. Les acides gras</u>	58
<u>I.3. Les phospholipides (PL)</u>	64
<u>I.4. Les triacylglycérols (TAG)</u>	66
<b>II. Métabolisme lipidique chez les CMA</b>	67
<u>II.1. Métabolisme stérolique chez les CMA</u>	67
<u>II.2. Métabolisme des acides gras, PL et TAG</u>	70
II.2.1. Spores en germination	70
II.2.2. Mycélium intra-racinaire	71
II.2.3. Transport des lipides de réserve du mycélium intra-racinaire vers le mycélium extra-racinaire des CMA	73
II.2.4. Mycélium extra-racinaire	74
<b>III. Rôle des lipides chez les CMA et dans l'interaction symbiotique</b>	76
<u>III.1. Rôle des lipides membranaires chez les CMA</u>	76
<u>III.2. Rôle des lipides en tant que biomarqueurs spécifiques des CMA</u>	78
III.2.1. Stérols	78
III.2.2. Acides gras	79
<u>III.3. Rôle des lipides dans l'interaction symbiotique</u>	80
<b>IV. Impact des polluants sur le métabolisme lipidique des CMA</b>	81
<u>IV.1. Impact des fongicides</u>	81
<u>IV.2. Impact des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs)</u>	82
<b>Partie 4. La phytoremédiation assistée par les CMA et la dégradation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques</b>	84
<b>I. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs)</b>	84
<u>I.1. Généralités</u>	84
<u>I.2. propriétés physico-chimiques des HAPs</u>	87
<u>I.3. Toxicité des HAPs</u>	88
<u>I.4. Source des HAPs</u>	91
<u>I.5. Teneurs des HAPs dans les sols</u>	92
<u>I.6. Législation et gestion des sols pollués en France</u>	96
<b>II. La phytoremédiation des sols pollués par les HAPs</b>	99
<u>II.1. Généralités - Mécanismes</u>	99
<u>II.2. Phytoremédiation assistée par les CMA</u>	105
II.2.1. Dissipation des HAPs par les mycorhizes arbusculaires	106
II.2.2. Bioaccumulation des HAPs dans les racines et le CMA	106
II.2.3. Transfert des HAPs aux parties aériennes de la plante	107
<b>Chapitre II. Matériels et méthodes</b>	
<b>I. matériels</b>	112
<u>I.1. Matériels biologiques</u>	112
I.1.1. Matériel fongique: champignon mycorhizien à arbuscules <i>Rhizophagus irregularis</i>	112

I.1.2. Matériel végétal: racines de chicorée ( <i>Cichorium intybus</i> L.)	112
<u>I.2. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques</u>	113
<b>II. Méthodes</b>	113
<u>II.1. Préparation des cultures monoxéniques</u>	113
II.1.1. le milieu de culture des racines de chicorée mycorhizées et non mycorhizées et du CMA	113
II.1.2. Introduction des HAPs dans le milieu de culture	116
II.1.3. Préparation des cultures monoxéniques de racines de chicorée mycorhizées ou non, dans le système de cultures en boîtes mono-compartmentées	116
II.1.4. Préparation des cultures monoxéniques de racines de chicorée mycorhizées ou non, dans le système de cultures en boîtes bi-compartmentées	116
<u>II.2. Mesure des développements fongiques</u>	117
II.2.1. Longueur des hyphes de <i>Rhizophagus irregularis</i>	117
II.2.2. Nombre de spores de <i>Rhizophagus irregularis</i>	117
<u>II.3. Récolte du matériel biologique</u>	117
<u>II.4. Détermination des taux de colonisation racinaire par <i>Rhizophagus irregularis</i></u>	118
<u>II.5. Analyses biochimiques</u>	119
II.5.1. Etude de la biosynthèse des lipides fongiques	119
II.5.2. Extraction et analyse des PL et des TAG	126
II.5.3. Activités enzymatiques et dosages protéiques	130
<u>II.6. Transport du P du mycélium extra-racinaire de <i>Rhizophagus irregularis</i> vers les racines de chicorée</u>	133
<u>II.7. Analyse quantitative de l'expression de gènes impliqués dans le transport du P chez <i>Rhizophagus irregularis</i></u>	134
II.7.1. Extraction de l'ARN fongique	134
II.7.2. Transcription inverse	135
II.7.3. Polymerase Chain Reaction (PCR) traditionnelle	135
II.7.4. PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)	136
<u>II.8. Dosage et analyse du B[a]P et des métabolites issus de sa dégradation</u>	137
II.8.1. Extraction du B[a]P	138
II.8.2. Analyse en GC	139
II.8.3. Analyse en GC-MS	139
<b>III. Analyses statistiques</b>	141

## Chapitre III. Résultats

### Article 1: The arbuscular mycorrhizal *Rhizophagus irregularis* activates storage lipid biosynthesis to cope with the PAHs oxidative stress

Présentation de l'article 1	142
Article 1	144
Principaux résultats	178

## **Article 2: Polyaromatic hydrocarbons impair phosphorus translocation by arbuscular mycorrhizal fungi**

Présentation de l'article 2	180
Article 2	182
Principaux résultats	212

## **Article 3: *In vitro* benzo[a]pyrene degradation by the arbuscular mycorrhizal fungus: *Rhizophagus irregularis***

Présentation de l'article 3	214
Article 3	216
Principaux résultats	247

## **Chapitre IV. Synthèse, Conclusion et Perspectives**

### **Discussion - Conclusion générale** 249

#### **I. Impact des HAPs sur le métabolisme des lipides membranaires** 251

I.1. Les stérols 251

I.2. Les phospholipides (PL) 251

#### **II. Impact des HAPs sur le transport du P par le CMA vers les racines** 252

#### **III. Dissipation du B[a]P par les racines, mycorrhizées ou non, et le CMA** 254

III.1. Bioaccumulation et biodégradation du B[a]P par les racines de chicorée mycorrhizées ou non 254

III.2. Bioaccumulation et biodégradation du B[a]P par le CMA 255

III.3. Détection et identification d'un métabolite issu de la dégradation du B[a]P 256

#### **IV. Implication du métabolisme des lipides de réserve dans la lutte contre le stress oxydant et la dégradation des HAPs** 257

#### **V. Conclusion générale** 259

### **Perspectives** 262

#### **I. Impact des HAPs sur le métabolisme lipidique du CMA** 262

I.1. Impact des HAPs sur le lipidome des microdomaines du CMA et de sa plante hôte 262

I.2. Impact des HAPs sur le métabolisme lipidique intra-racinaire 263

I.3. Impact des HAPs sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique 263

I.4. Interconnexions entre le métabolisme lipidique, le métabolisme glucidique et le stress oxydant induit par les HAPs dans le mycélium extra-racinaire du CMA? 264

<b>II. Impact des HAPs sur le transport du P par le CMA et sa plante hôte</b>	265
<b>III. Rôle du CMA dans la dissipation des HAPs</b>	266
<u>III.1. Prélèvement et transfert des HAPs par le CMA vers la plante hôte</u>	266
<u>III.2. Rôle des globules lipidiques: lieu de stockage ou de dégradation ou simples navettes de transport des HAPs?</u>	268
<u>III.3. Mécanismes impliqués dans la dégradation des HAPs par le CMA: y aurait-il une corrélation entre le stress oxydant et le dégradation des HAPs par le CMA?</u>	269
<b>Références bibliographiques</b>	271
<b>Annexe</b>	299



# Liste des abréviations

8-OHdG: 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine  
Acétyl-coA: Acétyl-coenzyme A  
ADEME: Agence de l'Environnement et de la  
Maîtrise de l'Energie  
ADN: Acide désoxyribonucléique  
AGNL : Acides Gras associés aux Lipides Neutres  
AGPL: Acides Gras associés aux Phospholipides  
AGS : Acyl-Glycosides de Stérols  
ANOVA: Test de comparaison multiple  
AP: Acide phosphatidique  
ARN: Acide ribonucléique  
ATP: Adénosine Triphosphate  
B[a]P: Benzo[a]pyrène  
BAS: Branched Arbuscular Structure  
Ca : Calcium  
CCM: Chromatographie sur Couche Mince  
Cd: Cadmium  
CF: Compartiment fongique des boîtes bi-  
compartimentées  
CLHP: Chromatographie Liquide Haute Pression  
CMA: Champignon(s) Mycorhizien(s) à  
Arbuscules  
CPG: Chromatographie en phase gazeuse  
Co : Cobalt  
CO<sub>2</sub>: Dioxide de carbone  
CR: Compartiment Racinaire des boîtes bi-  
compartimentées  
Cu: Cuivre  
DAG: Diacylglycérol  
DAPG : 2,4-diacetylphloroglucinol  
DEPC: Diéthyl Pyrocarbonate  
EEA : Agence de l'Environnement Européenne  
ERO: Espèce Réactive de l'Oxygène  
ETM: Eléments Traces Métalliques  
Fe: Fer  
GC: Gaz Chromatography  
GC-FID: GC équipée d'un détecteur à ionisation  
de flamme  
GC-MS: Gaz Chromatography- Mass  
Spectrometry  
GS: Glycosides de stérols  
GTP: Guanosine Triphosphate  
H: Hydrogène  
H<sub>2</sub>O: eau  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peroxyde d'hydrogène  
HAP(s): Hydrocarbure(s) Aromatique(s)  
Polycyclique(s)





HPLC: High Pressure Liquid Chromatography  
(Chromatographie Liquide Haute Pression)  
IARC: International Agency for Research on  
Cancer  
IBS: Inhibiteur de la Biosynthèse des Stéroïdes  
INERIS: Institut National de l'Environnement  
industriel et des Risques  
INRS: Institut National de Recherche et de  
Sécurité  
IRENI: Institut de Recherche en Environnement  
Industriel  
IUPAC: International Union of Pure and  
Applied Chemistry  
K: Potassium  
Log  $K_{ow}$ : coefficient de partage octanol/eau  
LSD: Least Significant Differences  
MDA: Malondialdéhyde  
Mn: Manganèse  
N: Azote  
Na: Sodium  
OMS: Organisation Mondiale de la Santé  
P: Phosphore  
Pb: Plomb  
PC: Phosphatidylcholine  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
PE: Phosphatidyléthanolamine  
PG: Phosphatidylglycérol  
PL: Phospholipides  
Poly-P: groupements polyphosphates  
POP : Polluants Organiques Persistants  
qRT-PCR: PCR en temps réel  
Rf: Reference Front (Front de solvant)  
RHD<sub>α</sub>: Ring Hydroxylating Dioxygenase  
RMN: Spectrométrie à Résonance Magnétique  
nucléaire  
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate  
SMCO: Syndicat Mixte de la Côte d'Opale  
SPE: Solid Phase Extraction  
SRDs: Sterol-Rich Domains  
STEB : Sucrose-Triton Extraction Buffer  
TAG: Triacylglycérol  
UCEIV: Unité de Chimie Environnementale  
et Interactions sur le Vivant  
ULCO: Université du Littoral Côte d'Opale  
US-EPA : Agence de Protection de  
l'Environnement Américaine  
UTP: Uridine Triphosphate  
TBE: Tampon Tris/Borate/EDTA  
VCI: Valeurs de Constat d'Impact  
VROM: Ministère du Logement, de  
l'Aménagement du Territoire et de  
l'Environnement des Pays-Bas  
Zn: Zinc



# Liste des figures

- Figure 1:** La diversité relative des types de mycorhizes présentes ou non chez les angiospermes, d'après 128 références bibliographiques incluant environ 8000 taxa (d'après Brundrett, 2009). 7
- Figure 2:** Principales formes de mycorhizes associées aux racines des plantes supérieures (d'après Le Tacon, 2008). 8
- Figure 3:** Les CMA forment un phylum indépendant, les Gloméromycètes (d'après Parniske, 2008). 11
- Figure 4:** Cycle de développement des *Glomus* (d'après Akiyama, 2007). 14
- Figure 5:** Signaux pré-symbiotiques (d'après Genre, 2012). 16
- Figure 6:** Structures chimiques de strigolactones naturelles: (A) 5-deoxy-strigol, (B) 4 strigolactones naturelles (d'après Akiyama et Hayashi, 2006). 17
- Figure 7:** Structures chimiques des Myc-LCO naturels ou synthétiques (d'après Maillet et al., 2007). 18
- Figure 8:** La voie de signalisation « *SYM pathway* » (d'après Hata et al., 2010). 20
- Figure 9:** Illustration des signaux de transduction communs entre les symbioses rhizobiennes et mycorhiziennes arbusculaires (d'après Bonfante et Requena, 2011). 22
- Figure 10:** Schéma résumant les différents comportements de la colonisation mycorhizienne à arbuscules et les changements cellulaires associés chez *Medicago truncatula* et *Daucus carota* (d'après Genre et al., 2008). 23
- Figure 11:** Schéma d'un arbuscule, la structure symbiotique de l'association MA (d'après Parniske, 2008). 25
- Figure 12:** Schémas des différentes formes de colonisation dans les racines (d'après Dickson, 2005). 26
- Figure 13:** Schéma récapitulant les principaux processus d'échanges de nutriments [phosphore (P), azote (N) et carbone (C)] dans l'ensemble des symbioses mycorhiziennes (d'après Bonfante et Genre, 2010). 32
- Figure 14:** Principales structures cellulaires dans lesquelles le phosphore est incorporé chez les plantes (d'après Maathuis, 2009). 36
- Figure 15:** Schéma récapitulant le mouvement de l'N dans la symbiose mycorhizienne à arbuscules (d'après Govindarajulu et al., 2005). 41

- Figure 16:** Observation au microscope des lipides de *Glomus intraradices* DAOM 197198 après (1) coloration au Fluorol Yellow 088 (d'après Fontaine, 2001) et (2) coloration des globules lipidiques d'une spore (a) et des hyphes germinatives (b) au rouge de Nile (d'après Bago et al., 2002a). 53
- Figure 17:** Schéma d'un stérol et numérotation du squelette des stéroïdes conformément aux règles de l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). 54
- Figure 18:** Structure des stérols majeurs chez les CMA. 56
- Figure 19:** Structure des glycosides de stérols et acyl-glucosides de stérols (AGS) (Christie, <http://lipidlibrary.aocs.org/lipids.html>). 56
- Figure 20:** Molécule de l'acide gras majoritaire chez les CMA, l'acide palmitoléique C16:1 $\omega$ 5. 59
- Figure 21:** (a) Schéma simplifié de la structure des phospholipides (d'après Ohlrogge et Browse, 1995). Head group = tête polaire; P = groupement phosphate; fatty acid = acide gras (b) Structure de la phosphatidylcholine. 65
- Figure 22:** Structure des triacylglycérols. En noir: le groupement glycérol, en violet: les chaînes acyles. 66
- Figure 23:** Biosynthèse des stérols chez *Glomus intraradices* DAOM 197198 (d'après Grandmougin-Ferjani et al., 2005). 69
- Figure 24:** Schéma simplifié de l'utilisation des lipides de réserve dans la biosynthèse des hexoses et du tréhalose dans les spores en germination des CMA (d'après Bago et al., 2000). 72
- Figure 25:** Métabolisme du carbone dans le mycélium intra-racinaire et extra-racinaire. (1): mitochondrie; (2) glyoxysome; (3) vésicules lipidiques (d'après Bago et al., 2000). 72
- Figure 26:** Biosynthèse des acides gras par le champignon intra- et extra-racinaire lorsque de l'acétate ou du saccharose sont fournis aux partenaires symbiotiques (d'après Trépanier et al., 2005). 73
- Figure 27:** Observation en microscopie à deux photons des vésicules lipidiques dans le mycélium extra-racinaire de *Glomus intraradices* DAOM 197198 durant la symbiose mycorhizienne (d'après Bago et al., 2002a). 74
- Figure 28:** Etapes critiques de l'activation et de la détoxification du B[a]P (d'après Lodovici et al., 2004). 89
- Figure 29:** Schémas présentant les voies métaboliques du B[a]P (a) et le comportement neurotoxique potentiel du B[a]P (b) (d'après Patri et al., 2009). 89-90
- Figure 30:** Schéma présentant les principaux procédés de phytoremédiation (d'après Sterckeman et al., 2012). 101

**Figure 31:** Schéma représentatif de la séparation des lipides totaux sur la plaque de silice (type Silicagel 60F<sub>254</sub>) après CCM avec le mélange de solvants de migration hexane/diéthylether/acide acétique glacial (78/20/4, v/v/v). 121

**Figure 32:** Phospholipides déposés sur les plaques de silice révélés grâce à l'iode bisublimé (photo a), la ninhydrine (photo b), le réactif de Dragendorff (photo c) et l'ammonium molybdate (photo d). Les bandes colorées les plus larges correspondent aux échantillons tandis que les autres taches correspondent aux témoins commerciaux. 123

**Figure 33:** Schéma récapitulatif de la méthodologie employée lors de l'expérience de marquage et d'extraction des différentes classes lipidiques fongiques. 125

**Figure 34:** Schéma récapitulatif de la méthodologie employée lors de l'extraction et de l'analyse des PL fongiques. 127

**Figure 35:** Schéma récapitulatif de la méthodologie employée lors de l'extraction et de l'analyse des TAG fongiques ou racinaires par colonne SPE. 128

**Figure 36:** Schéma récapitulatif de la méthodologie employée pour l'extraction et l'analyse du contenu enzymatique et protéique du matériel biologique. 133

**Figure 37:** Schéma récapitulatif de la méthodologie employée lors des principales étapes d'extraction du B[a]P du matériel biologique (racines et CMA) et du milieu de culture sur lequel il s'est développé ainsi que dans le milieu non inoculé (témoin abiotique). 140

**Figure 38:** Schéma récapitulatif de l'impact des HAPs sur la biosynthèse des lipides dans le mycélium extra-racinaire de *Rhizophagus irregularis*. 261

**Figure 39:** Schéma récapitulatif du transport du phosphore du milieu de culture jusqu'aux racines par le CMA *Rhizophagus irregularis* en présence des HAPs. 261

# Liste des photos

---

**Photo 1:** Boîte mono-compartmentée contenant du milieu M et inoculée avec un fragment de gélose contenant des racine de chicorée mycorhizées ou non. 115

**Photo 2:** Culture de racines de chicorée mycorhizées ou non en boîte mono-compartmentée après 9 semaines d'incubation. 115

**Photo 3:** Boîte bi-compartmentée contenant du milieu M et inoculée avec un fragment de gélose contenant des racine de chicorée mycorhizées. 115

**Photo 4:** Culture de CMA *Rhizophagus irregularis* en boîte bi-compartmentée après 9 semaines d'incubation. 115

**Photo 5:** Plantules de *Medicago truncatula* colonisées par un CMA, qui peut se développer dans le compartiment fongique dans le système de culture *in vitro* en boîte bi-compartmentées. CR = compartiment racinaire, CF = compartiment fongique (d'après Voets et al., 2009). 268

# Liste des tableaux

---

- Tableau 1:** Tableau récapitulatif des travaux décrivant l'impact de divers polluants sur les différentes étapes du cycle de développement des CMA. 30-31
- Tableau 2:** Composition en acides gras totaux des CMA isolés à partir de cultures en pots et monoxéniques. 61-63
- Tableau 3:** Principales propriétés physico-chimiques des 16 HAPs prioritaires définis par l'US-EPA ainsi que le coronène (d'après May et al., 1983; Miller et al., 1985; Mackay et al., 1992; Shuttleworth et Cerniglia, 1995; Feix et Wiart, 1995; Howard et Meylan, 1997; Lide, 2005; O'Neil, 2006; IARC; Rapport d'études INERIS 2005; Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, INERIS). 85-86
- Tableau 4:** Emission dans l'air (en tonnes) des 8 HAPs réglementés en France métropolitaine en 2010 (d'après CITEPA, 2012). 92
- Tableau 5:** Teneurs en mg/kg des 16 HAPs prioritaires classés par l'US-EPA sur différents sites pollués dans le monde. 94-95
- Tableau 6:** Valeurs guides hollandaises (1990), québécoises et VCI françaises pour différents HAPs classés prioritaires par l'US-EPA. 98
- Tableau 7:** Tableau récapitulatif des travaux portant sur la contribution de la colonisation mycorhizienne dans la dissipation, l'accumulation et la dégradation des HAPs. 109-111
- Tableau 8:** Structures et caractéristiques physico-chimiques de l'anthracène et du B[a]P. 113
- Tableau 9:** Composition du milieu M (Bécard et Fortin, 1988). 114
- Tableau 10:** Temps de rétention des standards PL, AP et TAG utilisés pour la détermination. 129



Introduction Générale

-

Objectifs





# Introduction générale - Objectifs

---

En France, l'héritage de plus de 200 ans d'activité industrielle, engendrant plus de 4 354 sites et sols pollués répertoriés (BASOL), a fait de la gestion des sols pollués un enjeu d'autant plus important que les questions de santé environnementale sont aujourd'hui au centre des préoccupations sociétales. C'est principalement la combinaison de deux phénomènes socio-économiques qui rend prioritaire la valorisation des sites pollués: les mutations du secteur industriel conduisent à l'arrêt de nombreuses exploitations et à l'augmentation du nombre de « friches industrielles ». Par ailleurs, la pression démographique et foncière en zones urbanisées incite à la reconversion de ces friches pour d'autres utilisations. La région Nord-Pas de Calais s'affiche en tête du classement national des dépenses consacrées aux investissements de protection de l'environnement (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) <http://www2.ademe.fr>). En effet, avec 590 sites et sols pollués recensés en 2012, la région Nord-Pas de Calais est la deuxième région la plus polluée en France après la Région Rhône-Alpes (BASOL, <http://basol.environnement.gouv.fr>). Dès le début du XIX<sup>ème</sup> siècle, avec la révolution industrielle en France, et notamment avec l'essor de l'industrie charbonnière dans le Nord-Pas de Calais, le rejet de polluants dans l'environnement s'est considérablement accru. D'ailleurs, la plus grande cokerie de France située à Drocourt dans le Pas de Calais (aujourd'hui fermée) illustre bien l'héritage d'un lourd passé industriel dans cette région. Au plus fort de son activité, cette cokerie produisait 5 050 tonnes par jour de coke grâce à 407 fours (<http://minesdunord.fr>), rejetant ainsi dans l'environnement une forte quantité de polluants.

Parmi les nombreux contaminants rencontrés dans les sols pollués, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) occupent le troisième rang à l'échelle nationale avec un taux de 16,62% après les hydrocarbures (39,06%) et le plomb (18,31%). C'est dans la Région Nord-Pas de Calais que l'on dénombre le plus de sols pollués par les HAPs en France avec 150 sites répertoriés (BASOL).

Les HAPs sont des polluants organiques persistants (POPs) issus de la combustion incomplète de matières carbonées, suite à des processus naturels et principalement anthropiques. Les HAPs accumulés dans le sol proviennent des dépôts atmosphériques, du ruissellement, des émissions domestiques et industrielles ainsi que du déversement direct de pétrole ou de produits pétroliers. Les HAPs présentent des effets nocifs pour la santé humaine

même à de faibles concentrations, dus à leur fort pouvoir cancérigène et/ou mutagène (White, 1986). L'exposition humaine aux HAPs peut se faire *via* l'alimentation, par voie pulmonaire ou par voie cutanée (Nielsen et al., 1996). Du fait de leur hydrophobicité élevée liée à la présence de noyaux aromatiques, ces molécules s'adsorbent fortement aux matières particulaires rendant leur élimination et/ou leur transformation difficiles. De plus, les HAPs sont peu biodégradables car faiblement biodisponibles, ce qui les rend persistants dans l'environnement. Sur la base de ces caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques, l'US-EPA a classé 16 de ces composés - dont l'anthracène (HAP de faible poids moléculaire) et le benzo[a]pyrène (B[a]P) (HAP de haut poids moléculaire) utilisés en tant qu'HAPs modèles lors du présent travail - comme polluants prioritaires, à surveiller et surtout à éliminer des sols pollués.

De nos jours, l'intérêt porté aux questions de santé environnementale par tous les acteurs de la société a fait des sites et sols pollués un enjeu prioritaire. Cet enjeu est rendu plus crucial par l'augmentation croissante du nombre de « friches industrielles » qu'il convient de reconverter pour restreindre l'étalement urbain dommageable à l'environnement.

Dans cette logique, la loi Grenelle II intègre la gestion et la remédiation des sites pollués dans ses dispositions, en soulignant dans son article 43 l'importance d'utiliser de préférence « les techniques de dépollution par les plantes ».

Les phytotechnologies s'appuient sur le principe de phytoremédiation, jugée *a priori* plus conforme aux enjeux du développement durable que les techniques physico-chimiques, qui, en dépit de leur rapidité (quelques heures à quelques mois), conduisent à l'altération des propriétés biologiques du sol. En plus d'être écologique, la phytoremédiation présente les avantages d'être moins onéreuse (au moins 10 fois inférieure aux méthodes physico-chimiques ou d'excavation) (Gerhardt et al., 2009) et applicable aux traitements *in situ* de grandes surfaces de sols contaminés. C'est également une technique facile à mettre en œuvre basée sur des pratiques agricoles simples nécessitant peu de technicité spécifique. En outre, contrairement aux méthodes classiques de traitement physico-chimique, la phytoremédiation est une technique qui génère peu de perturbation du sol, présentant une bonne intégration paysagère et une bonne acceptation par l'opinion publique.

Toutefois, cette phytotechnologie est encore limitée en termes d'efficacité, en particulier lorsqu'il s'agit des HAPs de poids moléculaires élevés en raison de leur nature récalcitrante et de leur phytotoxicité.

Ces techniques de remédiation *in situ* sont récentes: elles font l'objet de recherches depuis les années 1990 et une cinquantaine d'essais sont à ce jour répertoriés en Europe

(INERIS, 2010). D'importants progrès ont été réalisés au niveau expérimental, mais les connaissances sont encore parcellaires et l'application « pratique » de ces technologies démarre à peine.

La phytoremédiation est « l'utilisation des plantes vertes et de leur microbiote associé, d'amendement du sol et de techniques agricoles pour éliminer, contenir, ou rendre moins toxiques les contaminants environnementaux » (Bert et al., 2012). Les racines stimulent l'activité microbienne et modifient les propriétés physico-chimiques dans la rhizosphère. Parmi les microorganismes qui influencent les processus rhizosphériques figurent les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) qui sont omniprésents dans la plupart des sols naturels et anthropiques. On estime que plus de 80% des espèces végétales vivent en symbiose avec ces champignons (revue de Bonfante et Perotto, 1995). En échange des substances carbonées fournies par la plante, ces champignons apportent une meilleure nutrition hydrique et minérale à la plante améliorant ainsi sa croissance. A titre d'exemple, il a été montré que les plantes mycorhizées absorbent plus de Phosphore (P) que les plantes non mycorhizées avec un taux d'absorption du P par unité de longueur de racine colonisée 2 à 3 fois plus élevé que dans les racines non colonisées (Sieverding, 1991).

L'intérêt d'utiliser les mycorhizes comme outil de remédiation des sols pollués est multiple: (1) ils atténuent la phytotoxicité des polluants grâce à leur aptitude à stimuler les défenses des plantes contre les stress abiotiques tels que les polluants, (2) ils augmentent l'accès des plantes aux éléments nutritifs dans la rhizosphère, (3) ils favorisent l'élimination des polluants en modifiant les conditions physico-chimiques de la rhizosphère et les communautés microbiennes associées à celle-ci.

En effet, des travaux antérieurs menés à l'UCEIV ont montré que les HAPs provoquent un stress oxydant qui est atténué quand les racines sont mycorhizées (Debiane et al., 2008, 2009). Cette protection serait liée à la réduction de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) produite et par conséquent à une moindre formation du malondialdéhyde (MDA, marqueur de peroxydation lipidique) et d'adduits à l'ADN [8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG), marqueur d'altération de l'ADN], résultat d'une induction des enzymes antioxydantes, en particulier la superoxyde dismutase (SOD) intervenant dans l'élimination des ERO (Debiane et al., 2008, 2009). Une perturbation du contenu lipidique des deux partenaires symbiotiques a également été mise en évidence grâce au dosage des phospholipides et des stérols (Debiane et al., 2011, 2012). A l'issue de ces travaux, il apparaît que la mycorhization apporte une meilleure tolérance des plantes mycorhizées aux HAPs en

atténuant le stress oxydant et notamment en limitant les dommages membranaires et génomiques. Toutefois, ces précédents travaux ont montré que les HAPs perturbent les contenus lipidiques des deux partenaires symbiotiques mais ni la cible d'action de ces polluants au niveau du métabolisme lipidique, ni le rôle de ces modifications lipidiques dans la tolérance induite par les HAPs et dans leur dissipation, ne sont clairement définis. C'est pourquoi le premier objectif de la présente thèse a consisté à étudier l'impact des HAPs sur le métabolisme lipidique du CMA grâce à des expériences de radiomarquage par un précurseur de la biosynthèse des lipides, l'acétate [ $1-^{14}\text{C}$ ].

Par ailleurs, étant donné que l'impact des HAPs sur la croissance des CMA et leurs lipides membranaires pourrait avoir des effets délétères sur les mécanismes essentiels de la symbiose, notamment la nutrition minérale phosphatée, considérée comme l'un des bénéfices majeurs de la symbiose, l'étude du transport du P par le CMA du milieu vers la racine en présence des HAPs a constitué le deuxième objectif de cette thèse.

Enfin, de nombreux travaux ont montré que l'inoculation des plantes avec des CMA peut favoriser l'élimination des HAPs (Liu et al., 2004; Rabie, 2005; Cheung et al., 2008; Liu et Dalpé, 2009; Gao et al., 2011). Bien qu'aucune étude n'ait démontrée que les CMA pouvaient dégrader les HAPs, l'expérience de Verdin et al. (2006) réalisée à l'UCEIV avec des cultures monoxéniques suggère une contribution positive de l'association symbiotique sur la dissipation de l'anthracène en l'absence d'autres microorganismes telluriques. Cependant, ni la dissipation des HAPs lourds par la symbiose, ni le rôle direct du CMA dans la dégradation de ces polluants n'ont été abordés et restent donc à définir. C'est pourquoi, le troisième objectif de cette thèse vise à déterminer la contribution de la symbiose mycorhizienne arbusculaire et en particulier l'implication directe du CMA dans la dégradation d'un HAP modèle de haut poids moléculaire, le B[a]P.

Les différentes expériences, répondant aux objectifs (1, 2 et 3 définis ci-dessus) ont été menées sur les deux partenaires symbiotiques: racines de chicorée transformées par *Agrobacterium rhizogenes* et le CMA *Rhizophagus irregularis* cultivés en conditions monoxéniques. Grâce à l'incorporation de certains polluants dans le milieu de culture, ce système permet d'évaluer facilement et de façon reproductible la toxicité de ces composés (Wan et al., 1998, Ruffykiri et al., 2003, Campagnac et al., 2008, 2009 ; Debiante et al., 2008). L'utilisation de ce système de culture facilite également les analyses biochimiques et

moléculaires, puisqu'il permet d'obtenir de grandes quantités de matériels sans risque de contamination par des microorganismes. Au cours de cette étude, nous avons utilisé deux types de cultures *in vitro*: des boîtes mono-compartmentées et des boîtes bi-compartmentées. Le premier système nous a permis de mesurer l'impact des HAPs sur les organismes symbiotiques associés et leur contribution dans la dissipation des polluants. Le second nous a permis d'évaluer l'impact des HAPs sur le CMA et sa contribution dans leur dissipation.

Il est important de noter que le choix des deux HAPs testés (l'anthracène et le B[a]P) dans les expériences présentées dans ce travail de thèse repose sur plusieurs raisons: ils possèdent des structures chimiques différentes; l'anthracène étant un HAP léger ou de faible poids moléculaire (formé de 3 cycles benzéniques) et le B[a]P étant un HAP lourd ou de haut poids moléculaire (composé de 5 cycles benzéniques). Par conséquent, ils ont des propriétés physico-chimiques distinctes (solubilité, adsorption, persistance dans l'environnement, toxicité...). Le B[a]P fait partie du groupe 1 qui représente les composés cancérogènes pour l'homme, alors que l'anthracène est classé dans le groupe 3 qui correspond aux composés inclassables quant à leur effet cancérogène pour l'homme (effet possible mais pas assez étudié). Ils font, de ce fait, tous les deux partie des 16 HAPs prioritaires de l'US-EPA (agence de protection de l'environnement américaine). De plus, ce sont des HAPs fréquemment recensés dans les sites et sols pollués.

Il est également à signaler que le CMA étudié dans ce travail, auparavant nommé *Glomus intraradices* DAOM 197198 (Schenck et Smith, 1982) puis reclassé en tant que *Glomus irregulare* Blaszk., Wubet, Renker and Buscot DAOM 197198 (Stockinger et al., 2009; Sokolski et al., 2010) est désormais reconnu sous le terme de *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198 (Schüßler et Walker, 2010). Dans les citations bibliographiques, nous avons fait le choix de conserver l'appellation sous laquelle il apparaissait dans les publications. C'est pourquoi, à chaque fois qu'il sera précisé DAOM 197198 après *Glomus intraradices* ou *Glomus irregulare*, cette souche correspondra à *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198, utilisée dans le présent travail.

Pour tenter d'apporter des éléments de réponse aux objectifs que nous nous sommes fixés, notre travail se subdivise en quatre chapitres:

- **Le chapitre I** est une synthèse bibliographique portant sur la physiologie, le métabolisme lipidique des CMA et leur utilisation dans la phytoremédiation des sols pollués par les HAPs.
- **Le chapitre II** décrit les méthodologies expérimentales utilisées lors de ce travail pour répondre aux questions posées.
- **Le chapitre III** présente les résultats obtenus et leurs discussions, sous forme de 3 articles en anglais.

– L'article 1 concerne l'impact des HAPs sur le métabolisme lipidique des CMA. Cet article s'intitule: 'The arbuscular mycorrhizal *Rhizophagus irregularis* activates storage lipid biosynthesis to cope with the PAHs oxidative stress' par M. Calonne, J. Fontaine, D. Debiane, F. Laruelle, A. Grandmougin-Ferjani, A. Lounès-Hadj Sahraoui, soumis dans *New Phytologist*.

– L'article 2 traite de l'impact des HAPs sur l'un des principaux bénéfiques de la symbiose mycorhizienne à arbuscules, le transport du P par le CMA vers la plante. Cet article s'intitule: 'Polyaromatic hydrocarbons (PAHs) mixture impair phosphorus transport by arbuscular mycorrhizal fungi' par M. Calonne, J. Fontaine, B. Tisserant, H. Dupré de Boulois, A. Grandmougin-Ferjani, S. Declerck, A. Lounès-Hadj Sahraoui, soumis dans *Journal of Experimental Botany*.

– L'article 3 s'intéresse à l'étude de la dissipation du B[a]P par la symbiose mycorhizienne et le CMA. Cet article s'intitule: 'In vitro benzo[a]pyrene degradation by the arbuscular mycorrhizal fungus: *Rhizophagus irregularis*' par M. Calonne, D. Debiane, J. Fontaine, A. Grandmougin-Ferjani, A. Lounès-Hadj Sahraoui, soumis dans *Environmental Pollution*.

- **Le chapitre IV** constitue une discussion générale synthétique qui met en relation les principaux résultats obtenus dans les différentes expériences et débouche sur une conclusion générale ainsi que les perspectives envisagées pour la poursuite de ce travail.

Enfin, ce manuscrit se termine par les références bibliographiques citées dans la synthèse bibliographique ainsi que par une annexe regroupant les différentes valorisations auxquelles j'ai participé durant mes années de thèse.

# Chapitre I

---

## Synthèse bibliographique



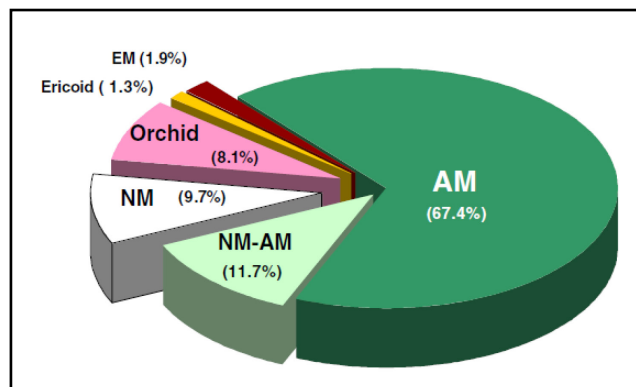


# Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

Les plantes vasculaires terrestres sont capables d'établir des symbioses avec de nombreux microorganismes. Ces symbioses sont très répandues dans les différents écosystèmes sur Terre, aussi bien dans les zones arides que dans les zones tempérées.

Au niveau des racines, les plantes peuvent s'associer avec un champignon mycorhizien pour aboutir à une association mycorhizienne (revue de Bonfante et Perotto, 1995), bénéfique pour les deux partenaires. Cette symbiose est référée comme étant une mycorhize, venant du grec « *mycos* », signifiant champignon et « *rhiza* », racine (revue de Parniske, 2008).

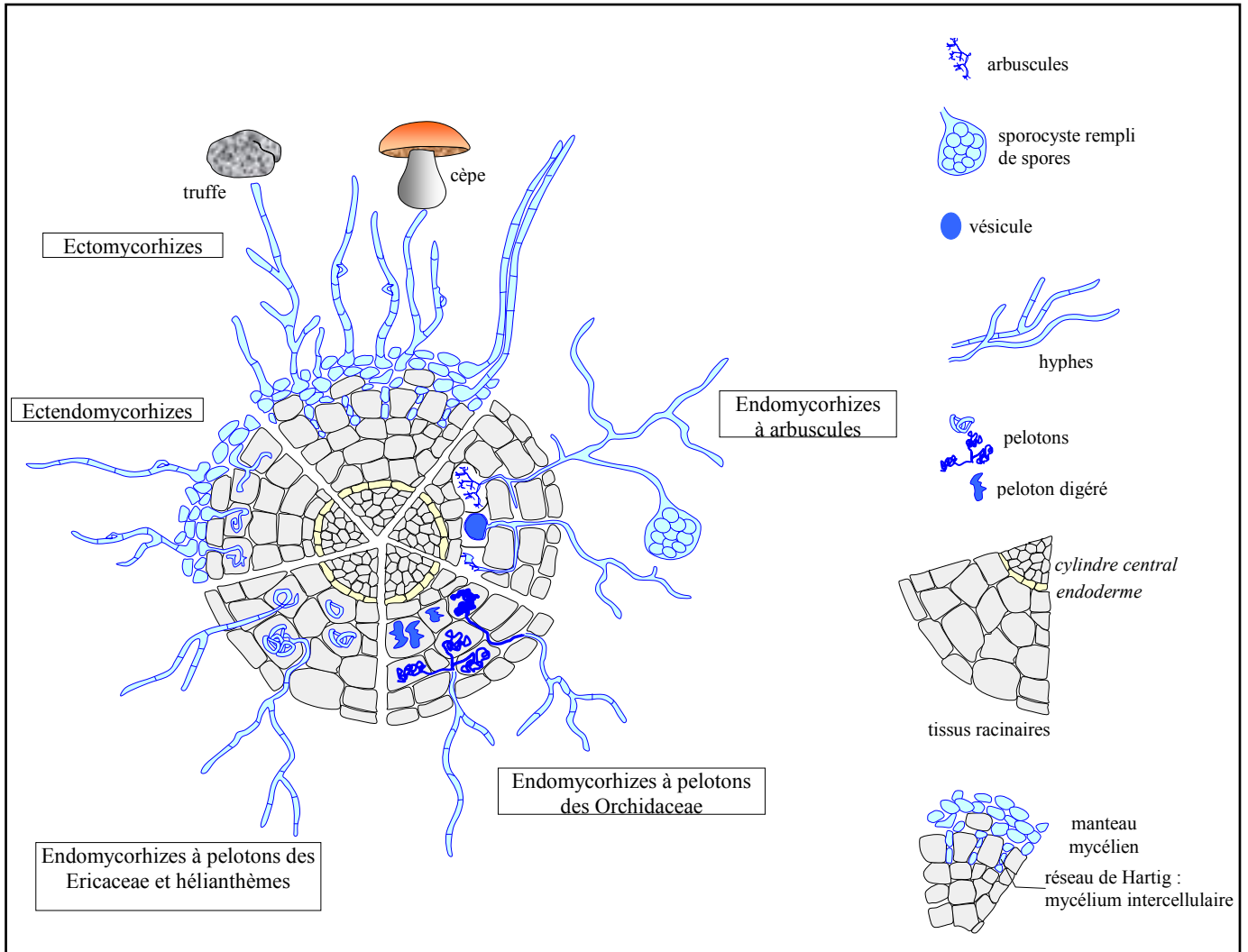
L'estimation de la diversité relative des types de mycorhizes existants ou non chez les angiospermes a été répertorié par Brundrett (2009), en utilisant les données de 128 travaux portant sur les plantes, soient 8 000 taxa végétaux. Cette compilation montre que la majorité des angiospermes, environ 90%, établissent l'une ou l'autre des différentes symbioses mycorhiziennes (Figure 1).



**Figure 1:** La diversité relative des types de mycorhizes présentes ou non chez les angiospermes, d'après 128 références bibliographiques incluant environ 8 000 taxa. AM: plantes établissant une symbiose mycorhizienne à arbuscules, Ericoid: plantes établissant une symbiose éricoïde, EM: plantes établissant une symbiose ectomycorhizienne, NM: plantes non mycorhizées, Orchid: plantes établissant une symbiose orchidoïde, NM-AM: regroupe les familles de plantes établissant de manière variable la symbiose mycorhizienne arbusculaire (d'après Brundrett, 2009).

La classification des symbioses mycorhiziennes impliquant différents champignons et différentes plantes hôtes est fondée sur des critères morphologiques, écologiques et

moléculaires. Ainsi, trois principaux types d'associations mycorhiziennes sont répertoriés: les ectomycorhizes, les endomycorhizes et les ectendomycorhizes (Peyronel et al., 1969; revues de Brundrett, 2002, 2004; Smith et Read, 2008) (Figure 2).



**Figure 2:** Principales formes de mycorhizes associées aux racines des plantes supérieures. En haut, les ectomycorhizes, caractérisées par la non pénétration des filaments souterrains du champignon dans les cellules racinaires et par la formation d'un « manteau » autour des fines racines. Les organes reproducteurs de ces champignons ectomycorhiziens peuvent être épigés ou hypogés. Les filaments externes sont figurés longitudinalement et les filaments intercellulaires sont figurés en coupe transversale. Chez les endomycorhizes, certains des filaments du champignon pénètrent à l'intérieur des cellules des racines:

- 1) les endomycorhizes à arbuscules sont les plus courantes. Les arbuscules, minuscules arborescences, sont toujours intracellulaires; les vésicules peuvent être à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules. Ce type de mycorhizes est associé à la grande majorité des plantes arbustives et herbacées, aux arbres fruitiers, aux arbres tropicaux;
- 2) les endomycorhizes des orchidées qui forment des pelotons dans les cellules;
- 3) d'autres endomycorhizes à pelotons existant dans les cellules racinaires des bruyères et de certaines plantes méditerranéennes comme les hélianthèmes. Les champignons associés aux hélianthèmes sont les terfèzes ou truffes du désert;
- 4) les ectendomycorhizes, caractérisées par un manteau et par la pénétration des filaments à l'intérieur des cellules sous forme de pelotons. Elles existent chez certains arbres forestiers (Hallé, 2008, figure modifiée d'après Le Tacon, 1985).

# **I. Les différents types de mycorhizes**

## I.1. Les ectomycorhizes

Le réseau de Hartig, constitué d'un labyrinthe d'hyphes fongiques s'insinuant entre les cellules racinaires de la partie externe du parenchyme cortical, ne pénètre pas dans les cellules de l'hôte, ce qui permet d'identifier cette forme de symbiose entre le champignon et la racine d'association ectomycorhizienne (Franck, 1885; Harley et Smith, 1983; Brundrett, 2004) (Figure 2). Ce réseau constitue le siège des échanges nutritifs entre le champignon et la plante (Burgess et al., 1994; Dell et al., 1994; Smith et Read, 1997). En se développant progressivement entre les cellules du cortex racinaire et à l'extérieur de la racine, il forme ainsi un manchon dense recouvrant entièrement la racine, le manteau fongique. Le développement des hyphes extra-racinaires issus du manteau fongique explorent le sol et y absorbent les nutriments.

Les champignons ectomycorhiziens représentent plus de 5000 espèces fongiques (Barker et al., 1998). Ce sont essentiellement des Ascomycètes (dont les familles les plus fréquemment rencontrées sont les *Elaphomycetaceae* et les *Terfeziaceae*) ou des Basidiomycètes (les *Agaricaceae*, les *Amanitaceae*, les *Boletaceae*). Ils sont retrouvés dans de nombreux habitats mais les associations ectomycorhiziennes sont restreintes à certaines familles végétales. En effet, cette association concerne principalement les *Pinaceae*, les *Betulaceae*, les *Fagaceae*, les *Salicaceae*, les *Myrtiliaceae*, les *Abietaceae*, les *Tiliaceae* et les *Ulmaceae*, ce qui représente uniquement 3% des taxa végétaux [dont 1,9% des Angiospermes (Brundrett, 2009)], principalement les arbres et arbustes des régions boréales, tempérées et montagneuses et de certaines régions tropicales (Harley, 1984; Smith et Read, 2008).

## I.2. Les ectendomycorhizes

Ce type de mycorhize présente à la fois des structures d'ectomycorhizes et des structures d'endomycorhizes (Figure 2). Le champignon forme un manteau et un réseau de Hartig intercellulaire rappelant les structures développées par les champignons ectomycorhiziens, mais en plus les hyphes fongiques pénètrent à l'intérieur des cellules, soit sous forme de pelotons intracellulaires (mycorhizes arbutoïdes) (Münzenberger et al., 1992), soit sous forme d'hyphes très courts (mycorhizes monotropoïdes) (Dexheimer et Gérard,

1993). Les ectendomycorhizes arbutoïdes se trouvent particulièrement chez les genres *Arbutus* et *Arctostaphylos* de la famille des *Ericaceae* et les monotropoïdes chez les genres *Monotropa* et *Pyrola* de la famille des *Pyrolaceae* (Laurent, 1995; Nakas et Hagedorn, 1990; Smith et Read, 2008).

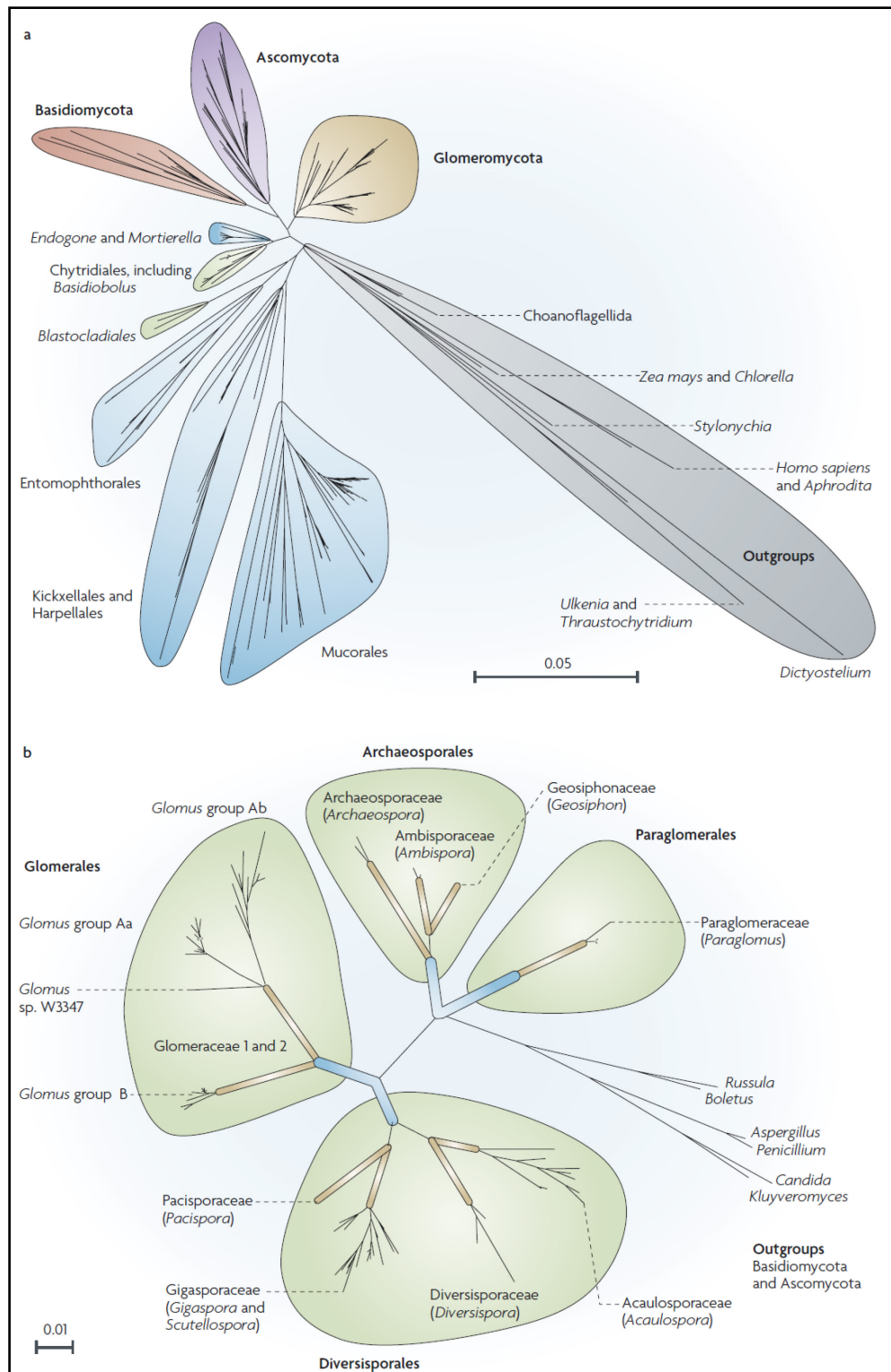
### I.3. Les endomycorhizes

Ces champignons mycorhiziens développent des hyphes qui pénètrent à l'intérieur des cellules du cortex racinaire, soit sous forme de pelotons d'hyphes intracellulaires, dont les endomycorhizes formées par les *Ericaceae* et par les *Orchidaceae*, soit sous forme d'arbuscules pour former les symbioses mycorhiziennes à arbuscules (Figure 2).

Les champignons endomycorhiziens éricoïdes sont des ascomycètes qui colonisent spécifiquement des plantes de la famille des *Ericaceae* (des genres comme *Calluna*, *Erica*, *Vaccinium*, *Rhododendron*). Un mucilage fongique se forme au niveau de l'extrémité de la racine et s'accroît sur toute la surface de la racine (Smith et Read, 1997).

Le partenaire fongique réalisant la symbiose endomycorhizienne orchidoïde est souvent un Basidiomycète. On trouve les genres *Rhizoctonia*, *Sebacina*, *Tulasnella* et *Russula*. Chez l'hôte végétal, les graines et embryons des *Orchidaceae* ont très peu de réserves et dépendent entièrement du champignon mycorhizien pour germer et se développer durant les premiers stades de son cycle de vie (Rasmussen, 1995; Smith et Read, 2008). Le partenaire mycorhizien fournit alors tous les nutriments à son hôte végétal, dont le carbone: il s'agit de mycohétérotrophie (Leake, 1994). Cependant, la nature mutualiste de la symbiose mycorhizienne des orchidées fait encore débat (Rasmussen et Rasmussen, 2009) car il est difficile de concevoir ce que la graine d'orchidée peut céder à son partenaire (Martos, 2010).

Par ailleurs, certaines espèces d'orchidées adultes ne possèdent pas de capacités photosynthétiques et certains travaux ont montré que ces plantes obtiennent le carbone des espèces végétales autotrophes environnantes *via* les champignons mycorhiziens (McKendrick et al., 2000) démontrant une mycohétérotrophie totale, tandis que d'autres espèces chlorophylliennes obtiennent jusqu'à 85% de leur budget carboné de cette manière (Gebauer et Meyer, 2003), démontrant une mycohétérotrophie partielle. Encore une fois, les avantages conférés par cette association pour le champignon mycorhizien restent peu connus et il a été suggéré que cette relation soit en réalité de type parasitisme (Selosse et al., 2002).



**Figure 3:** Les CMA forment un phylum indépendant, les Glomérômycètes. a: un arbre phylogénétique montrant les Glomérômycètes en relation avec les autres principales lignées fongiques: les Ascomycètes et les Basidiomycètes et les non-monophylétiques Chytridiomycètes (vert) et les Zygomycètes (bleue) (Schüßler et al., 2001). Tous les membres des Glomérômycètes forment la symbiose MA et tous les CMA sont membres des Glomérômycètes. b: Les relations phylogénétiques entre les membres des Glomérômycètes. Parmi les 4 ordres connus, les *Archeosporales* et les *Paraglomérales* sont clairement distinctes des sous-groupes *Glomérales* et *Diversisporales*. La phylogénie et la taxonomie des CMA sont toujours ouvertes à débat. Par exemple, en raison de la divergence significative parmi les *Glomeraceae*, cette famille sera probablement séparée dans le futur. L'échelle représente le nombre de substitutions par site. Figure a modifié, avec permission, de Schüßler et al. (2001). Figure b modifiée de Schüßler (2002) (d'après Parniske, 2008).

La symbiose mycorhizienne à arbuscules est la symbiose terrestre la plus répandue (Fitter, 2005) et est formée par 80% des plantes vasculaires terrestres (revue de Bonfante et Perotto, 1995; Smith et Read, 2008; Brundrett, 2009) avec des champignons qui appartiennent au phylum monophylétique des Gloméromycètes (Schüßler et al., 2001) (Figure 3a). La taxonomie basée sur des analyses moléculaires, en particulier sur l'analyse de la petite sous-unité de l'ARN ribosomique 18S a permis de construire l'arbre phylogénétique des Gloméromycètes. Ce phylum regroupe à ce jour 216 espèces décrites regroupées en 4 ordres: les *Glomerales*, les *Diversisporales* et deux lignées plus anciennes: les *Paraglomerales* et les *Archeosporales*, 13 familles et 19 genres (Schüßler et al., 2001; Schüßler, 2002) (Figure 3b).

Ces CMA très anciens ont coévolué avec les plantes depuis au moins 460 millions d'années, permettant probablement la colonisation des terres émergées par les plantes supérieures (Remy et al., 1994; Redecker et al., 2000; Wang et al., 2010) grâce à l'amélioration de la nutrition notamment en phosphore des plantes.

A ce jour, la génomique des CMA est très peu connue, aucune séquence génomique n'étant disponible. Les quelques travaux sur la génomique des CMA ont montré que des milliers de noyaux coexistent dans un même cytoplasme dans les hyphes et les spores (Jany et Pawlowska, 2010; revue de Song et Kong, 2012). Le polymorphisme génétique dans une même spore ayant été observé, il a été suggéré que les CMA soient hétérocaryotiques ou homocaryotiques avec un polymorphisme intranucléaire (noyaux polyploïdes) (Kuhn et al., 2001; Hijri et Sanders, 2004; Pawloska et Taylor, 2004; revue de Song et Kong, 2012). D'autres travaux suggèrent que les CMA soient homocaryotiques et leurs noyaux haploïdes (Stukenbrock et Rosendahl, 2005). *Glomus intraradices* DAOM 197198 cultivé *in vitro* possédant un petit génome estimé à 16,5Mb (Hijri et Sanders, 2004) a été sélectionné pour devenir CMA modèle pour le séquençage du génome (Martin et al., 2004). Cependant, la taille du génome de *Glomus intraradices* a été de nouveau estimée et semblerait atteindre en réalité 154,8 Mb (Sędziewska et al., 2011). En raison du polymorphisme du CMA, le séquençage du génome de *Rhizophagus irregularis* a été difficile à réaliser. Aujourd'hui, ce séquençage est terminé et devrait être publié dans les prochains mois (publication en cours de rédaction, communication personnelle de Annegret Kohler, INRA Nancy). En revanche, la première analyse du transcriptome de *Glomus intraradices* DAOM 197198 à l'échelle du génome entier a récemment été publiée (Tisserant et al., 2012). Cette analyse a permis d'identifier les gènes pouvant être impliqués dans la symbiose et de démontrer l'existence de caractéristiques communes uniquement aux profils d'expression de *Glomus intraradices* DAOM 197198 et des champignons ectomycorhiziens, tels que *Laccaria bicolor* et *Tuber*

*melanosporum*. En particulier, l'induction des gènes codant pour des transporteurs membranaires et pour de petites protéines sécrétées durant l'interaction symbiotique et l'absence d'expression d'enzymes hydrolytiques agissant sur les polysaccharides de la paroi végétale ont été mis en évidence. Le génome de *Glomus intraradices* DAOM 197198 code également un grand nombre de protéines n'ayant pas été identifiées dans d'autres génomes, suggérant leur origine et leur maintenance chez ces champignons pour des fonctions exclusives à ces organismes (Tisserant, 2011; Tisserant et al., 2012).

### I.3.1. Cycle de développement des CMA

Les CMA sont des biotrophes obligatoires car hétérotrophes pour le carbone et sont incapables de compléter leur cycle de vie de manière asymbiotique (Bonfante et Bianciotto, 1995). Peut-être à cause de leur très ancienne association avec les plantes, les CMA ont perdu cette capacité à vivre et à terminer leur cycle vital en absence de l'hôte végétal (Requena et al., 2007). D'après ces auteurs, l'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules commence par la colonisation d'une racine compatible avec les hyphes germinatives produites par les propagules de CMA (spores asexuées ou racines déjà mycorhizées).

Après observation des CMA *Glomus intraradices* DAOM 197198 et *Glomus versiforme* cultivés *in vitro*, Strullu et al. (1997) ont proposé un cycle de développement des espèces du genre *Glomus* divisé en cinq stades (Figure 4):

**Stade 1 :** Germination des spores et émergence d'un mycélium primaire (promycélium),

**Stade 2 :** Contact racinaire et développement d'un appressorium,

**Stade 3 :** Pénétration du champignon dans la racine et mise en place de la forme intraracinaire du champignon. Le mycélium progresse à l'intérieur du système racinaire, forme des vésicules et éventuellement des arbuscules chez certaines espèces,

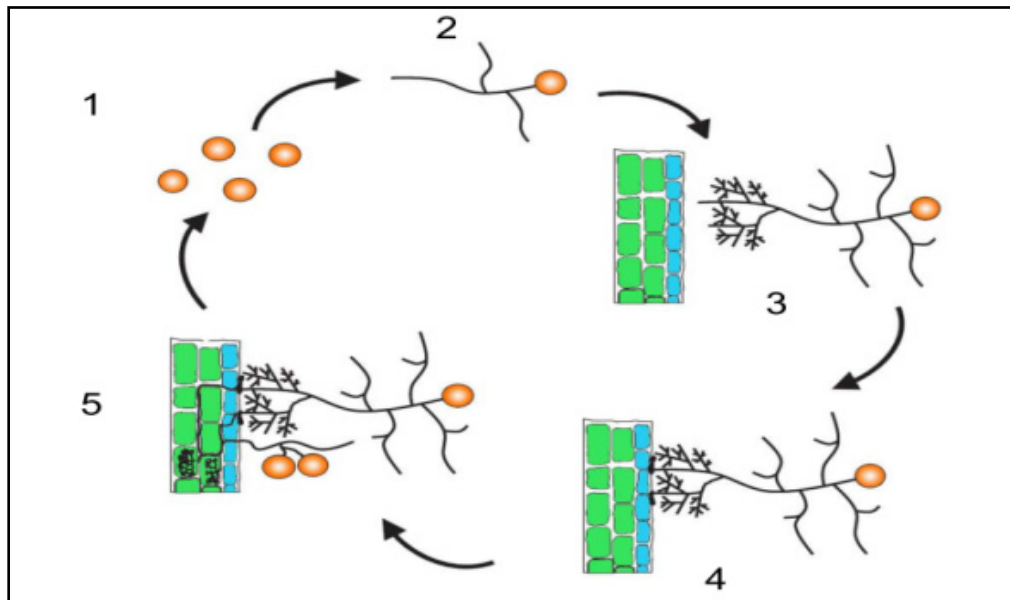
**Stade 4 :** La mycorhize ainsi constituée produit un réseau extra-racinaire le long duquel sont différenciées de nouvelles spores,

**Stade 5 :** Après leur maturation, ces spores seront à l'origine du promycélium de départ (**stade 1**).

D'après Strullu et al. (1997), lors de la sénescence des racines ou simplement des tissus corticaux, les vésicules sont libérées dans le sol. Celles-ci se développent selon un mode saprophytique et sont à l'origine d'un réseau extra-racinaire constituant un thalle. Après



maturation et libération des chlamydo-spores du tissu végétal (**Stade 5**), celles-ci deviennent aptes à réinfecter les racines en produisant un promycélium (**Stade 1**). La formation de nouvelles mycorhizes peut être initiée à partir de différents inocula: spores, vésicules et fragments racinaires colonisés.



**Figure 4:** Cycle de développement des *Glomus* (d'après Akiyama, 2007).

L'établissement de la symbiose peut être divisé en deux phases primordiales: la phase asymbiotique, durant lesquels les deux partenaires entreprennent une série d'échanges de signaux coordonnés et de changements morphologiques, permettant l'entrée du CMA à l'intérieur des racines. Ainsi, la phase symbiotique débute, durant laquelle les échanges entre les deux partenaires peuvent avoir lieu.

### I.3.2. La phase asymbiotique

- Germination de la spore et ramification de l'hyphes germinative

Les CMA produisent un grand nombre de spores rondes à paroi épaisse, d'un diamètre de 50 à 100  $\mu\text{m}$  contenant environ 2000 noyaux par spore (Bécard et Pfeffer, 1993) et stockant de grandes quantités d'éléments carbonés, principalement sous forme de lipides de réserve (revue de Sancholle et al., 2001). Les spores des CMA germent dans des conditions appropriées durant 2 à 3 semaines, pendant lesquelles les hyphes germinatives se développent.

De nombreux facteurs influent sur la germination de la spore: la teneur en CO<sub>2</sub>, le pH dont l'optimum de germination va dépendre d'une espèce à l'autre; la température du sol qui doit être comprise entre environ 10 et 30°C pour un optimum de germination; l'humidité du sol; les nutriments plus ou moins présents et assimilables; la présence de plantes hôtes/non hôtes et/ou de microorganismes pouvant activer ou inhiber la germination (revue de Giovannetti et al., 2010).

Le CMA asymbiotique étant inefficace dans l'absorption du carbone dans la matrice du sol, il est nécessaire que certains métabolismes soient activés pendant le germination afin de produire le tube germinatif, tels que les métabolismes du glycogène et surtout celui des lipides, constituant les principales réserves en éléments carbonés dans les spores, en particulier les triacylglycérols ou TAG (Beilby, 1980; Beilby et Kidby, 1980a; Gaspar et al., 1994a; Fontaine et al., 2001a; Sancholle et al., 2001). La métabolisation des lipides occupe donc une place centrale chez ces organismes, la croissance du tube germinatif étant dépendante de la disponibilité des réserves lipidiques de la spore (Fontaine et al., 2001a; Sancholle et al., 2001) et du protoplasme contenant les organites nécessaires au développement du tube. Pour explorer le milieu, ce tube germinatif a une croissance rectiligne puis se ramifie à différents niveaux (Dalpé et al., 2005). Les hyphes germinatives issues de la spore sont coenocytiques et des études cytologiques ont montré que la division nucléaire ayant lieu dans les hyphes germinatives était nécessaire pour la croissance hyphale (Bianciotto et al., 1995; Requena et al., 2000).

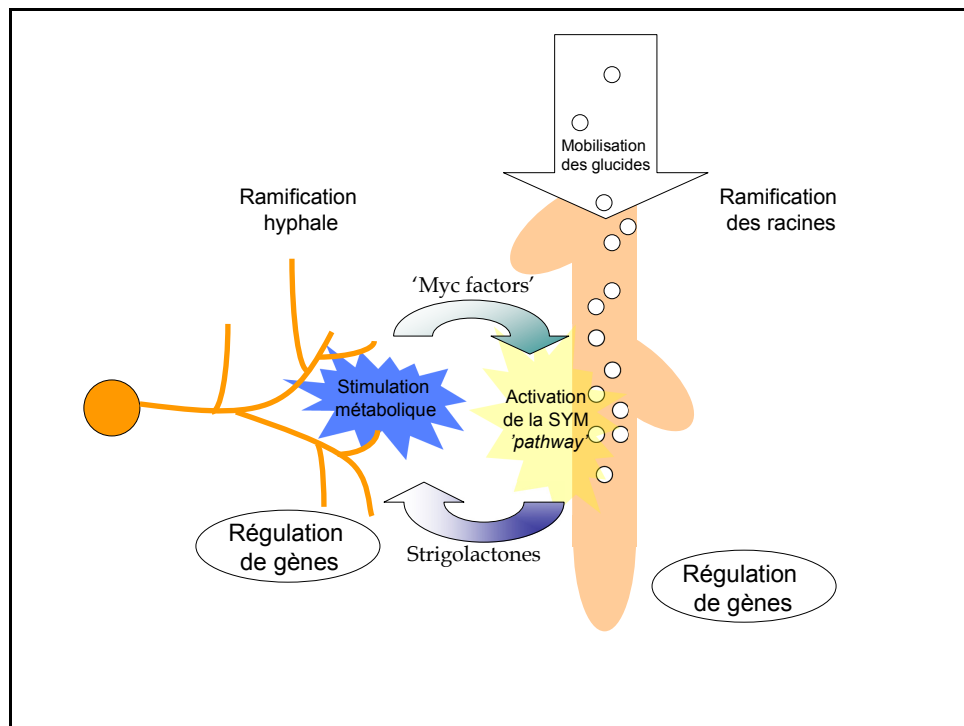
En revanche, en absence de plante hôte à proximité de la spore 2 à 4 semaines après le début de la germination, cette spore entre à nouveau en dormance et les hyphes cessent de croître, le protoplasme se rétracte et les ressources ne sont plus mobilisées en vue de la production d'une hyphe germinative en attendant de meilleures conditions (Logi et al., 1998). L'arrêt de la germination avant l'épuisement complet des ressources serait une stratégie pour augmenter les chances de rencontre avec une racine hôte appropriée et la coloniser (Bago et al., 2000). Par ailleurs, Requena et al. (2000) ont caractérisé le gène *GmTOR2* chez *Glomus mosseae*, homologue du gène *TOR2* contrôlant le cycle cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae* et les résultats ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle *GmTOR2* pourrait contrôler l'arrêt du cycle cellulaire dans la spore en germination en absence de plante à proximité comme une réponse au manque de nutriments. Cependant, les spores des CMA sont capables de germer à nouveau et entrer à nouveau en dormance de nombreuses fois si des signaux racinaires ne sont pas perçus par le CMA. En effet, les spores de *Gigaspora*

*margarita* sont capables d'alterner dormance et germination jusqu'à plus de 10 fois (Koske, 1981).

Au contraire, si le CMA perçoit une racine hôte à proximité, l'hyphe germinative se ramifie de manière importante dans le sol, des signaux seront envoyés par les deux organismes et le champignon passe alors au stade pré-symbiotique (Buée et al., 2000).

- Communication pré-symbiotique

La symbiose est initiée par la communication à travers des signaux diffus dans le sol entre les deux partenaires (Figure 5), leur permettant d'être informé de leur présence respective avant contact physique entre les symbiotes (revue de Bonfante et Genre, 2010) et induisant l'activation de gènes préparant le contact entre les deux symbiotes.

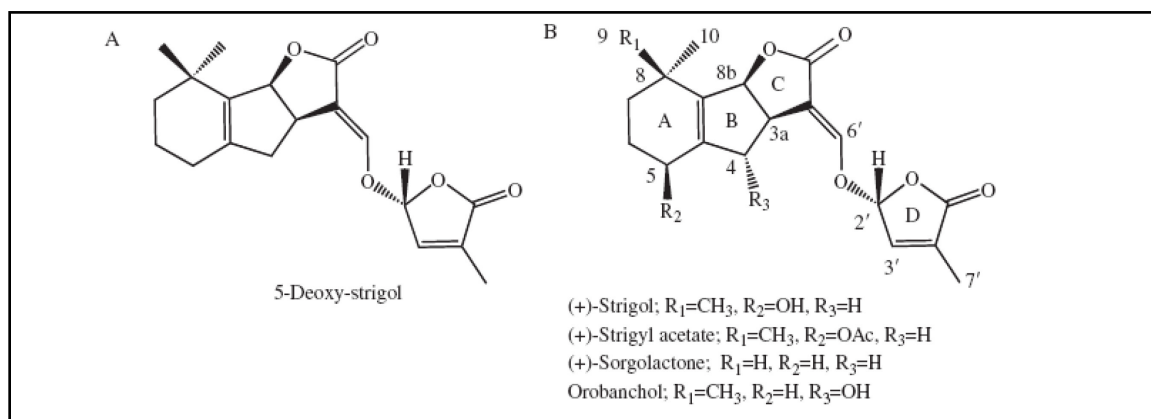


**Figure 5:** Signaux pré-symbiotiques.

Le schéma résume les principales réponses observées chez la plante et le champignon durant la phase pré-symbiotique dans l'interaction mycorhizienne à arbuscules. Les strigolactones excrétées par la plante hôte activent le métabolisme fongique, stimule la ramification racinaire et induit la régulation de certains gènes chez le CMA. En même temps, la perception des '*Myc factors*' (encore non identifiés) par la plante engendre l'activation de la voie de transduction du signal SYM, menant à la régulation de certains gènes, l'accumulation d'amidon dans la racine et le développement de nouvelles racines latérales (d'après Genre, 2012).

– Signaux émis par les végétaux

Le CMA perçoit la présence d'une racine grâce aux exsudats racinaires excrétés dans le sol. Ces molécules induisent l'augmentation du métabolisme fongique, l'élongation et la ramification hyphale (Bécard et Piché, 1989; Buée et al., 2000; Nagahashi et Douds, 2000), l'absorption de phosphate par les tubes germinatifs (Lei et al., 1991) et l'hyperpolarisation de la membrane plasmique fongique (Ayling et al., 2000; Ramos et al., 2008). En effet, les exsudats racinaires stimulent l'efflux de  $H^+$ , ainsi que l'activité de l' $H^+$ -ATPase de la membrane plasmique et le prélèvement de  $^{32}P_i$  démontré dans les spores en germination de *Gigaspora margarita* (Lei et al., 1991; Ramos et al., 2008). Buée et al. (2000) ont proposé que ces molécules induites soient de nature lipophile. Dénommées « *branching factors* » (Buée et al., 2000; Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006), ces molécules ont été identifiées comme étant des strigolactones: le 5-deoxy-strigol (Figure 6) (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006). En effet, de faibles concentrations de 5-deoxy-strigol ( $0,2 \mu M$ ) appliquées sur l'hyphe primaire ont induit une ramification d'hyphes secondaires après 24h (Akiyama et al., 2005). Depuis quelques années, ces molécules commencent à être considérées comme des nouvelles hormones végétales, jouant un rôle important dans la physiologie de la plante, incluant le développement des bourgeons et des racines (revue de Koltai, 2011)



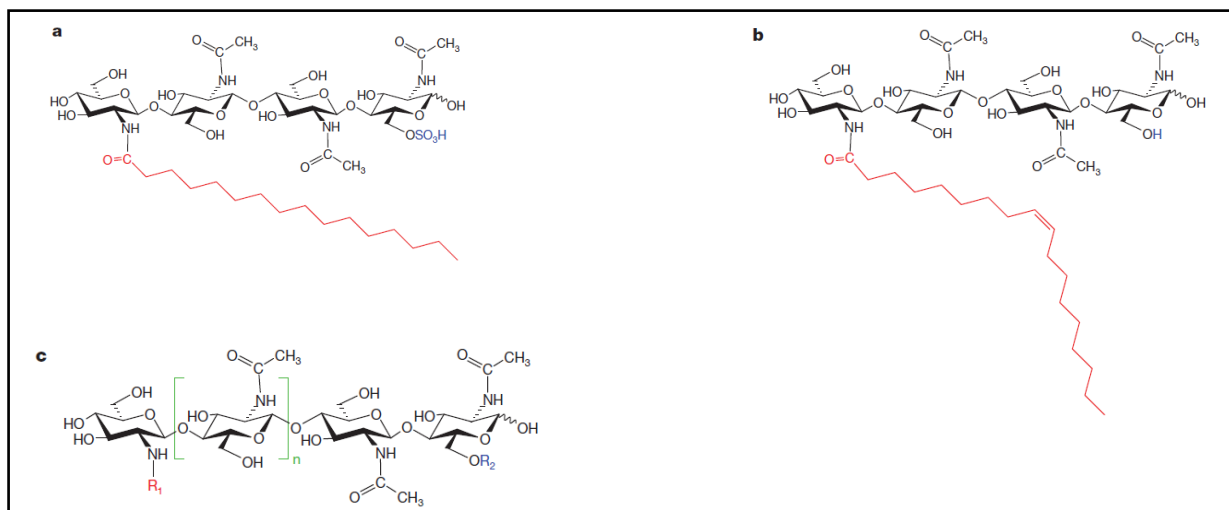
**Figure 6:** Structures chimiques de strigolactones naturelles: (A) 5-deoxy-strigol, (B) 4 strigolactones naturelles (d'après Akiyama et Hayashi, 2006).

– Signaux émis par le CMA

De même que pour les signaux « *Nod factors* » émis par les Rhizobiums, les CMA produisent des molécules diffuses qui leur permettent d'être reconnus par les plantes et que l'on appelle les « *Myc factors* » (revues de Paszkowski, 2006; Bonfante et Requena, 2011) et

induisant l'activation de gènes relatifs à l'établissement de la symbiose. Cependant, peu de choses sont connues à ce jour sur la nature de ces composés.

La chitine, un polymère de N-acétyl-D-glucosamine, est un composé de la paroi fongique absent dans les cellules végétales et que les plantes peuvent détecter de la même manière que pour les « *Nod factors* ». Etant donné les similitudes entre les mécanismes de perception des molécules de chitine et des « *Nod factors* » par les plantes, il est possible que ce mécanisme soit conservé pour la perception des « *Myc factors* » (revue de Bucher et al., 2009). Plus récemment, Maillet et al. (2011) ont démontré que les CMA sécrétaient des signaux symbiotiques reconnus comme étant des lipochitooligosaccharides (LCO) (Figure 7), et que ces facteurs étaient détectés dans les racines colonisées par *Glomus intraradices* et ses spores en germination. Les LCO mycorhiziens sont constitués d'un mélange de LCO sulfatés ou non-sulfatés, N-acétylés avec des acides gras à 16 ou 18 atomes de carbone et possédant 0, 1 ou 2 insaturations (Maillet et al., 2011).



**Figure 7:** Structures chimiques des Myc-LCO naturels ou synthétiques. a, b: Structures chimiques proposées des deux Myc-LCO majoritaires, (a) LCO tétraédrique sulfaté (C16:0) et (b) LCO tétraédrique sulfaté (C18:1ω9). (c) Structure générale des Myc-LCO.

Que ce soit pour les Myc-LCO naturelles ou synthétiques,  $n=1$  ou  $2$ ,  $R_2 = H$  ou  $SO_3H$ . Pour les Myc-LCO naturelles,  $R_1 = C16$ ,  $C16:1$ ,  $C16:2$ ,  $C18:0$  ou  $C18:1\omega9$ ; pour les Myc-LCO synthétiques,  $R_1 = C16:0$  ou  $C18:1\omega9$  (d'après Maillet et al., 2011).

#### – Détection par les plantes des "Myc factors" émis par les CMA

Les premiers travaux montrant la réception et la réponse biochimique et moléculaire des plantes aux signaux envoyés par les CMA afin de préparer l'entrée du champignon dans la racine datent d'une dizaine d'années. Certaines études ont démontré que les « *Myc factors* » envoyés par les CMA induisaient une faible mais significative augmentation de la longueur

des racines latérales (Oláh et al., 2005; Mukherjee et Ané, 2011) et l'accumulation de glucides (amidon) dans le cortex racinaire chez les plantes de *Lotus japonicus* exposées pendant une semaine à des exsudats fongiques ou développées en présence d'une membrane empêchant le contact avec le champignon et la colonisation (Gutjahr et al., 2009). L'accumulation des glucides dans les cellules corticales des racines serait une préparation essentielle à la colonisation future. En effet, ces glucides seront ensuite apportés au CMA (revue de Genre, 2012).

Après réception du signal envoyé par le CMA, certains gènes végétaux semblent être activés. Chabaud et al. (2002) et Kosuta et al. (2003) ont été les premiers à montrer que le signal envoyé par les CMA induisait l'expression du gène *ENOD11* codant pour une noduline, dans les racines de *Medicago truncatula*, à proximité des hyphes fongiques. De plus, le gène *MSBPI* codant pour une protéine se liant aux stéroïdes membranaires ainsi que d'autres gènes végétaux sont également surexprimés dans les tissus racinaires de *Medicago truncatula* à l'approche d'hyphes ramifiées de CMA, suggérant que des signaux de nature lipidique soient émis par les CMA (Kuhn et al., 2010).

Cependant, malgré les nombreux travaux démontrant la réactivité des plantes à l'approche des CMA et la progression des connaissances sur la nature des signaux émis par les CMA, de nombreux aspects concernant la perception des signaux émis et les différents mécanismes induits chez les symbiotes restent encore inconnus à ce jour.

En aval des récepteurs végétaux impliqués dans la perception des « *Myc factors* » sont localisés de nombreux gènes et protéines positionnés le long d'une voie de signalisation partiellement caractérisée allant de la paroi cellulaire jusqu'au noyau, dénommée « *symbiosis (SYM) pathway* » (Figure 8) (Oldroyd et Downie, 2006; revue de Genre, 2012). Cette voie semble être impliquée dans le contrôle de l'établissement de la symbiose, en particulier juste avant le contact entre les deux symbiotes et les premières étapes de la colonisation. D'ailleurs, la mutation d'un de ces gènes bloque la colonisation fongique au niveau des cellules épidermiques et sous-épidermiques (revue de Bonfante et Genre, 2010).

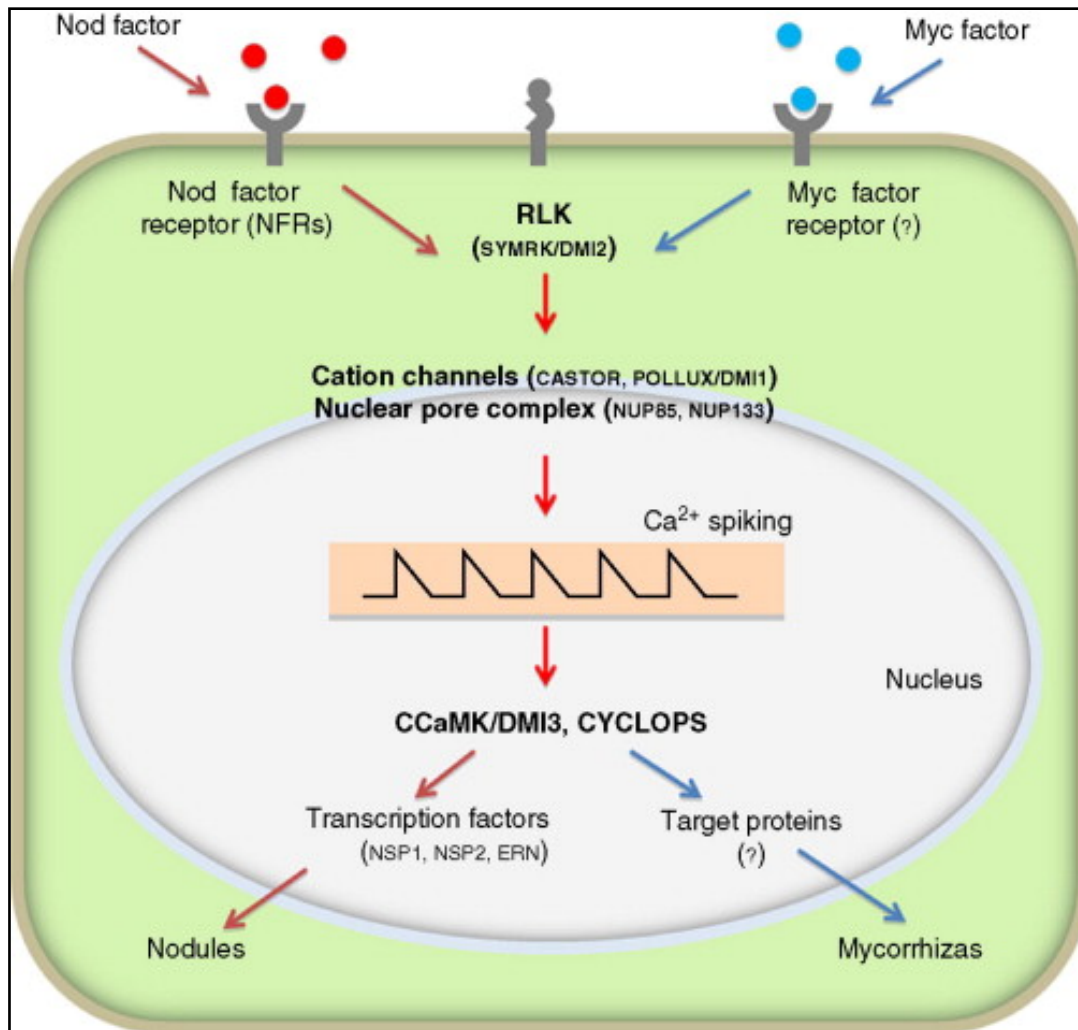


Figure 8: La voie de signalisation « SYM pathway » (d'après Hata et al., 2010).

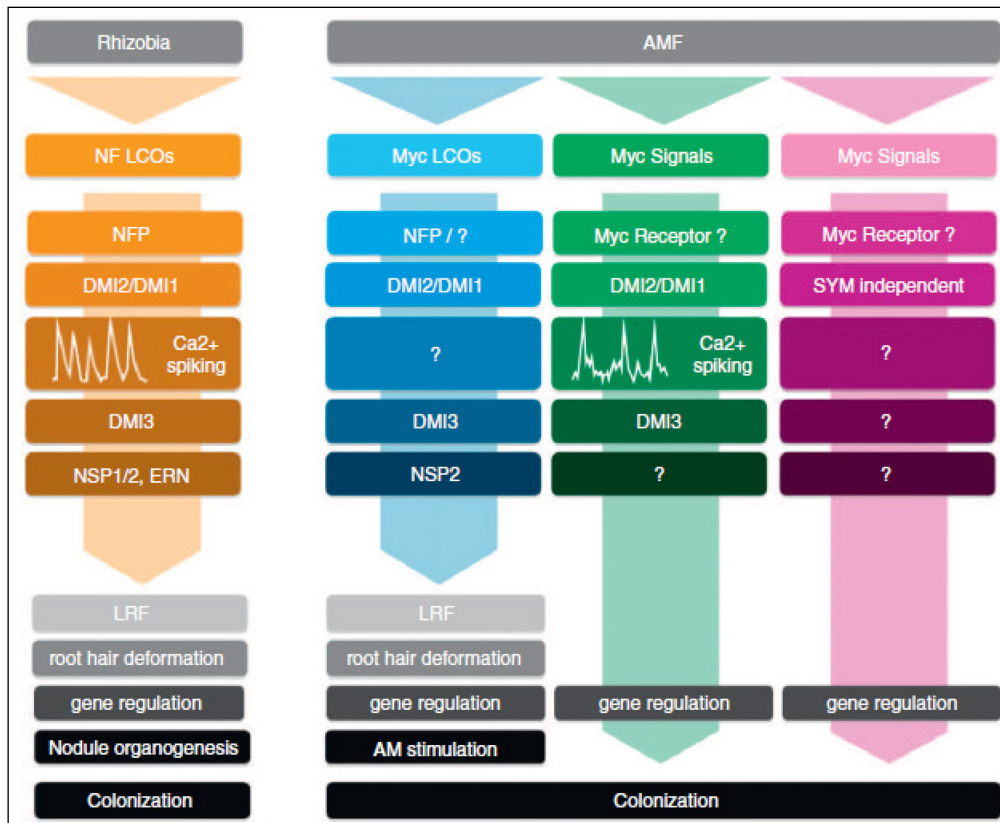
A ce jour, aucun récepteur spécifique des « Myc factors » n'a été identifié. Récemment, il a été affirmé que les récepteurs racinaires des « Myc factors » seraient complètement différents des « Nod factors » (Hayashi et al., 2010). Cependant, chez la plante *Parasponia* pouvant former à la fois des nodules et des mycorhizes, le gène *NFP*, codant pour un récepteur de « Nod factor » est requis pour la formation mycorhizienne, alors que les gènes homologues à *NFP*: *NFR1* et *NFR5* chez *Lotus japonicus* et *NPF* chez *Medicago truncatula* codant pour des récepteurs de « Nod factors » ne sont pas impliqués dans l'établissement de la symbiose mycorhizienne (Op den Camp et al., 2011). C'est pourquoi, chez les plantes supérieures comme les Fabacées, les gènes codant pour des récepteurs des signaux émis par le CMA seraient des gènes homologues des récepteurs de « Nod factors » *NFR1* et *NFR5* (revue de Song et Kong, 2012).

Le seul récepteur connu à ce jour est celui que partage la symbiose mycorhizienne avec la symbiose racine-nodule des Fabacées, le récepteur kinase DMI2 (pour *Doesn't Make*

*Infection*) chez *Medicago truncatula* ou SYMRK chez *Lotus japonicus* (Stracke et al., 2002; Endre et al., 2002; Yoshida et Parniske, 2005), pouvant percevoir directement ou indirectement les signaux mycorhiziens ou rhizoïdes (Markmann et al., 2008) et traduisant le signal jusqu'au cytoplasme en phosphorylant un substrat inconnu [probablement une protéine cytoplasmique libre (revue de Genre, 2012)] grâce à son domaine kinase (revue de Bonfante et Genre, 2010). La localisation nucléaire de tous les éléments en aval de la « *SYM pathway* » suggère que le signal est rapidement traduit dans le noyau. Le rôle des canaux nucléaires est fortement suggéré par la participation de deux nucléoporines (*LjNUP85* et *LjNUP133*) dans cette voie. Ces deux gènes sont connus pour leur propriété régulatrice de la symbiose mycorhizienne (Saito et al., 2007). Les protéines *LjCASTOR/POLLUX* (*MtDMI1* chez *Medicago truncatula*) codent pour un canal potentiel à cations localisé sur l'enveloppe nucléaire et sont requis pour la cascade calcique (revue de Parniske, 2008; Capoen et al., 2011). *MtDMI1* et *MtDMI2* chez *Medicago sativa*, sont tous deux essentiels pour le début des oscillations calciques dans le noyau et le cytoplasme périnucléaire *via* les tunnels et les transporteurs de  $Ca^{2+}$  (Oldroyd et Downie, 2004; Kosuta et al., 2008). Il semblerait que les oscillations de  $Ca^{2+}$  relative aux CMA serait plus faible et plus irrégulière que celle induite par les « *Nod factors* » (Kosuta et al., 2008; Hazledine et al., 2009; Chabaud et al., 2011), pouvant ainsi permettre aux plantes de différencier les signaux envoyés par les bactéries des CMA. *LjCCaMK* codant pour une protéine kinase calcium/calmoduline dépendante (homologue de *MtDMI3*) localisée dans le nucléoplasme est connu pour décoder la signature des oscillations calciques et pour interagir avec *LjCYCLOPS* (revue de Parniske, 2008; Yano et al., 2008; Ovchinnikova et al., 2011), une autre protéine nucléaire à la fonction encore inconnue, homologue de *MtIPD3* (pour *Interacting Protein of DMI3*), menant éventuellement à la régulation des gènes et à la colonisation. Une protéine récemment identifiée appelée CIP73 pourrait également interagir avec CCaMK et constituerait ainsi un nouveau régulateur (Kang et al., 2011; revue de Song et Kong, 2012).

Les nombreuses méconnaissances situées le long de la « *SYM pathway* » suggèrent l'existence de différentes voies de signalisation inconnues à ce jour induisant différentes réponses chez la plante aux signaux émis par les CMA (Figure 9). Les exemples proviennent de la démonstration de la régulation de gènes induits dans la symbiose indépendante de la « *SYM pathway* » chez le riz (Gutjahr et al., 2009) et chez *Medicago truncatula* (Oldroyd et Downie, 2004). Les CMA sont donc capables de générer un nombre de molécules activant différentes voies de signalisation. Un seul des gènes bloqués stoppe la colonisation au niveau épidermique ou sous-épidermique (revue de Bonfante et Genre, 2010)



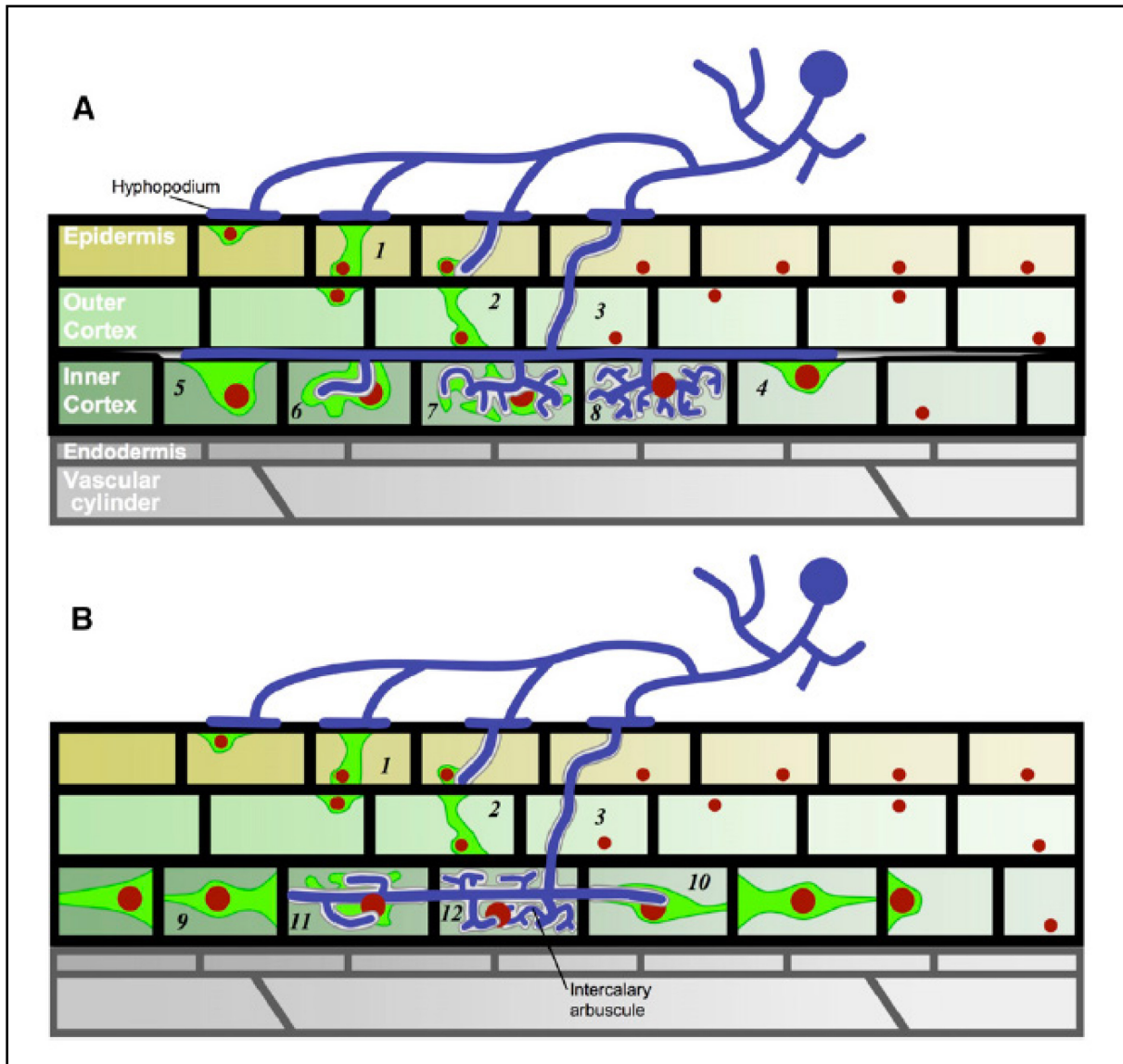


**Figure 9:** Illustration des signaux de transduction communs entre les symbioses rhizobiennes et mycorhiziennes arbusculaires. Bien que les Myc-LCO soient soupçonnés d'utiliser les mêmes voies que celles de la nodulation, la « *SYM pathway* » est commune, d'autres voies dans la transduction du signal de la symbiose mycorhizienne arbusculaire sont également suggérées. De ce fait, d'autres signaux « *Myc factors* » (i.e. chitooligosaccharides) peuvent aussi fonctionner de manière dépendante de la voie 'SYM', alors que d'autres dont la nature est toujours inconnue, sont indépendants de la voie SYM (d'après Bonfante et Requena, 2011).

- Formation de l'appressorium et de l'appareil de pré-pénétration (APP)

Suite aux échanges intenses réalisés par les deux symbiotes, l'entrée du CMA dans la racine peut alors commencer. Au contact de la racine, les hyphes du CMA s'arrondissent et s'aplatissent sur la paroi de cellules épidermiques et se ramifient jusqu'à développer un appressorium (ou hyphopodium) (revue de Genre et al., 2005). La formation de l'appressorium chez *Glomus mosseae* induit l'augmentation de l'expression d'un gène codant pour l'H<sup>+</sup>-ATPase (Requena et al., 2003), montrant une corrélation avec de précédentes études ayant mis en évidence une augmentation de l'activité ATPasique (Lei et al., 1991) et la dépolarisation de la membrane (Ayling et al., 2000) quand l'hyphe du CMA entre en contact avec les racines.

L'appressorium adhère intimement avec l'épiderme des racines et leurs parois s'imbriquent. Par la suite, la croissance fongique s'arrête environ 4 à 6h durant lesquelles les cellules végétales et fongiques se préparent à la colonisation (revue de Genre et al., 2005).



**Figure 10:** Schéma résumant les différents comportements de la colonisation mycorhizienne à arbuscules et les changements cellulaires associés chez *Medicago truncatula* et *Daucus carota* (d'après Genre et al., 2008).

Chez les deux plantes, l'adhésion d'un hyphopodium fongique à la surface des racines mène à la formation d'un appareil de pré-pénétration (APP) dans la cellule épidermique végétale au contact de cet hyphopodium (1). Ce phénomène initie la formation d'un autre APP dans les cellules corticales sous-jacentes (2). Après avoir orienté radialement la croissance fongique dans les cellules corticales internes (3), la colonisation longitudinale et les réponses des cellules corticales internes diffère entre les deux plantes.

Chez *Medicago truncatula* (A), les hyphes intercellulaires se développent le long et entre les cellules. Les noyaux des cellules végétales au contact de ces hyphes se positionnent près de ces derniers et les agrégations cytoplasmiques débutent (4). La pénétration dans les cellules corticales internes est précédée par la formation d'un APP (5 et 6). Les agrégations cytoplasmiques s'organisent le long de l'hyphe intracellulaire primaire venant d'entrer dans la cellule (6 et 7), puis des hyphes arbusculaires très fins se développent (8)

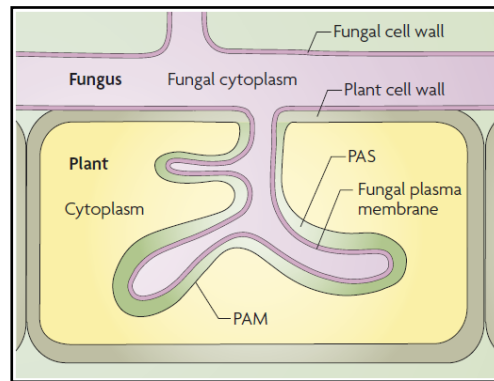
Chez *Daucus carota* (B), les cellules corticales internes sont progressivement colonisées par des hyphes individuels intracellulaires qui se déplacent d'une cellule à une autre. La colonisation fongique est dirigée par la formation des APP des cellules végétales adjacentes en avant de l'extrémité hyphale. (9 et 10). Comme pour *Medicago truncatula*, les agrégations cytoplasmique s'organisent autour de l'hyphe intracellulaire primaire (11) ce qui précède la formation d'hyphes latérales arbusculaires (12).

Les structures sont représentées avec le code couleur suivant: rouge: noyau, vert: agrégation cytoplasmique, blanc: interface périfongique, bleu: champignon.

Chez la plante, de nombreux gènes sont alors induits, tels que *ENOD11* (codant pour une noduline) déjà actif lors de la phase pré-symbiotique, au niveau des cellules proches de l'appressorium (Chabaud et al., 2002). D'autres nouveaux gènes sont alors activés, tels que ceux codant pour des «*germin-like*», des «*nodulines 26-like*» et quatre autres protéines dont la fonction est encore inconnue à ce jour et qui sont activées lors du développement de l'appressorium de *Glomus mosseae* sur les racines de *Medicago truncatula* (Brechenmacher et al., 2004). D'autres gènes codant pour une protéine de la paroi cellulaire (*ENOD12A*) et une C1p sérine protéase (qui pourrait être impliquée dans l'échange de signaux entre les deux partenaires symbiotiques) sont activés dans les racines du pois durant la formation de l'appressorium (Albrecht et al., 1998; Roussel et al., 2001). Enfin, ceux impliqués dans la réorganisation de la paroi cellulaire et la défense chez les cellules épidermiques (revue de Balestrini et Lanfranco, 2006; Siciliano et al., 2007) vont leur permettre de réorganiser leur cytoplasme pour produire une structure spécifique à la symbiose mycorhizienne à arbuscules, indispensable à la pénétration du CMA dans les cellules végétales: l'appareil de pré-pénétration (APP) (Figure 10) (Genre et al., 2005, 2008). Lors de la formation de cet APP, les noyaux des cellules épidermiques migrent tout d'abord très près de l'appressorium et en se déplaçant, laissent derrière eux un agrégat de microtubules, de microfilaments d'actines et de réticulum endoplasmique qui croît dans la cellule et permet de contrôler l'entrée du CMA dans la cellule (revue de Song et Kong, 2012).

### I.3.3. Phase symbiotique

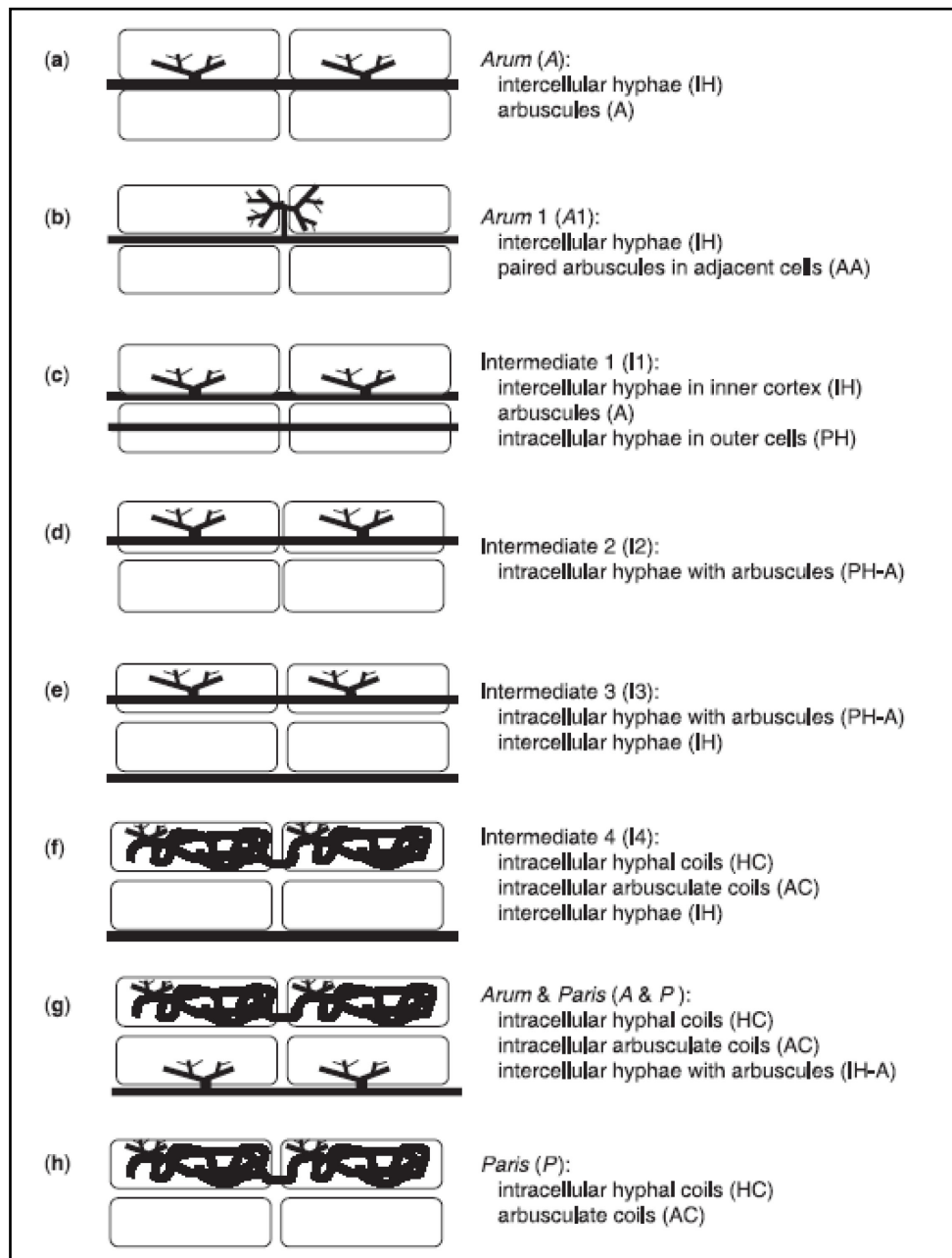
Les hyphes du champignon progressent jusqu'aux cellules corticales internes, où le CMA forme des structures intracellulaires hautement ramifiées en forme d'arbres (revue de Bonfante-Fasolo, 1984) connues comme étant des arbuscules (du latin «*arbusculum*», signifiant buisson ou petit arbre) (Figure 11) et représentant la structure la plus importante des CMA (revue de Bonfante-fasolo, 1984). Ces arbuscules sont des structures présentant un rapport surface/volume beaucoup plus important que pour une hyphe normale (Reinhardt, 2007). Pendant longtemps, les arbuscules ont été considérés comme des structures modifiées d'haustorium (Gerdemann, 1968; Smith et Smith, 1990).



**Figure 11:** Schéma d'un arbuscule, la structure symbiotique de l'association MA. Chaque ramification fongique à l'intérieur de la cellule végétale est entourée par une membrane péri-arbusculaire dérivée de la plante (PAM), qui est continue avec la membrane plasmique végétale. Elle exclut le champignon du cytoplasme végétal. L'interface apoplasmique entre la membrane plasmique du champignon et la PAM est appelée l'espace péri-arbusculaire (PAS). Du fait de la synthèse potentielle de la membrane fongique et de la PAM par la paroi cellulaire, le PAS comprend à la fois le matériel de la paroi cellulaire fongique et végétale (d'après Parniske, 2008).

La morphologie des arbuscules peut différer. Deux formes principales sont ainsi distinguées: *Arum* et *Paris*. Ces deux formes peuvent coexister dans une même plante et des formes intermédiaires entre ces deux formes sont également observées (Figure 12) (Dickson, 2005; revue de Dickson et al., 2007).

Le type *Arum*, le plus répandu, est caractérisé par une hyphe intercellulaire qui pénètre une cellule corticale dans laquelle un arbuscule se développe à l'extrémité de l'hyphe. Le second type, *Paris*, est caractérisé par l'absence d'hyphe intercellulaires et par un développement à l'intérieur des cellules corticales de pelotons sur lesquels se déploient les arbuscules (revue de Smith et Smith, 1997). Les mécanismes intervenant dans la formation d'une forme de colonisation particulière dans la racine mycorhizée ne sont pas clairement connus (Dickson et al., 2007). En effet, bien que la morphologie de l'arbuscule soit contrôlée par la plante hôte, et plus précisément par l'espace intercellulaire (Brundrett et Kendrick, 1988, 1990), elle est également contrôlée par l'identité du CMA (Cavagnaro et al., 2001). L'influence des propriétés du sol n'est pas à exclure car elles peuvent influencer le taux de croissance racinaire et ainsi agir sur l'étendue de l'espace intercellulaire (revue de Dickson et al., 2007).



**Figure 12:** Schémas des différentes formes de colonisation dans les racines. (a) forme *Arum* 1; (b) forme *Arum* 2; (c) forme intermédiaire 1; (d) forme intermédiaire 2; (e) forme intermédiaire 3; (f) forme intermédiaire 4; (g) forme *Arum* et *Paris* et (h) forme *Paris* (d'après Dickson, 2005).

Le développement des arbuscules est un processus complexe qui implique la différenciation terminale de l'hyphe fongique en concomitance avec une réorganisation cellulaire transitoire et une reprogrammation transcriptionnelle des cellules corticales racinaires (Zhang et al., 2010). Certaines modifications de la cellule corticale surviennent même avant l'entrée du champignon dans la cellule, et de nombreuses preuves suggèrent

qu'un signal mobile sur de courtes distances initie la reprogrammation de la cellule corticale pour potentiellement la préparer à l'entrée de l'hyphe (Liu et al., 2003; Genre et al., 2008). Le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les mitochondries se rassemblent autour de l'arbuscule, la vacuole se fragmente, le noyau migre de la périphérie de la cellule jusqu'au centre et certaines modifications dans le nombre et la connections des plastes sont observées (Fester et al., 2001).

L'arbuscule n'est pas en contact direct avec le cytoplasme de la cellule végétale. La structure fongique est intimement enveloppée par une membrane végétale, la membrane péri-arbusculaire et ainsi, l'aire de contact entre le champignon et la plante augmente fortement quand les arbuscules sont formés (revue de Bonfante-Fasolo, 1984; Alexander et al., 1989; Smith et Smith, 1990; Pumplin et Harrison, 2009). L'interface entre l'arbuscule et la cellule végétale sont le lieu d'échanges des nutriments entre les symbiotes (revues de Reinhardt, 2007; Parniske, 2008) qui feront l'objet d'une partie approfondie (partie 3, I. et II.). En effet, de nombreux transporteurs sont présents au niveau de cette interface (Fester et al., 2001). D'ailleurs, en dehors des transporteurs de P, relativement peu de choses sont connues actuellement sur cette membrane, son origine, sa composition lipidique ainsi que les autres activités induites dans les transports n'ont pas encore été décrites (Zhang et al., 2010). Deux gènes ont été mis en évidence chez *Medicago truncatula* (*STR* et *STR2*) codant pour des transporteurs half-ABC. Les deux protéines obtenues interagissant pour former un hétérodimère réside dans la membrane péri-arbusculaire, où son activité est essentielle pour le développement de l'arbuscule, le transporteur STR/STR2 étant probablement impliqué dans le transport d'un substrat encore inconnu de la cellule corticale jusqu'à l'espace apoplasmique péri-arbusculaire (Zhang et al., 2010).

Les arbuscules ne sont pas des structures permanentes, ils dégèrent après quelques jours de symbiose. Alexander et al. (1989) estiment que le développement de l'arbuscule prend 2,5 jours et occupe 33% du temps requis pour le cycle total (soit 7,5 jours) mais Bonfante et Genre (2010) estiment plutôt la durée de vie des arbuscules à 4-5 jours. Ce phénomène semble être sous le contrôle de la plante par des mécanismes encore mal connus, peut-être pour limiter l'extension du CMA dans les racines (revue de Strack et al., 2003; Genre et al., 2005, 2009; Walter et al., 2007).

Les CMA forment également des structures de stockage intercellulaires, riches en lipides de réserve, les vésicules (Biermann et Linderman, 1983; Jabaji-Hare et al., 1984). Ces structures peuvent être localisées à l'intérieur des cellules racinaires ou à l'extérieur et

peuvent devenir des propagules capables de coloniser une autre plante (Biermann et Linderman, 1983; revue de Smith et Smith, 1997; Declerck et al., 1998). Cependant, ces structures sont parfois absentes de certains champignons endomycorhiziens tels que les Gigasporales (Biermann et Linderman, 1983; Oehl et al., 2011). De ce fait, pour désigner l'ensemble des champignons du phylum des Glomeromycètes capables de développer des mycorhizes arbusculaires, les auteurs maintenant s'accordent à utiliser le terme de « mycorhizes à arbuscules » plutôt que l'ancienne dénomination de « mycorhizes à arbuscules et vésicules » plus restrictive.

Au contraire, toutes les espèces de CMA forment un important réseau d'hyphes extra-racinaires. Une fois la colonisation établie, ce réseau extra-racinaire pourra prélever les nutriments dans le sol, produire de nouvelles spores et former de nouvelles mycorhizes avec les plantes à proximité (Paszkowski, 2006; revue de Balestrini et Lanfranco, 2006).

Trois stades de développement du mycélium extra-racinaires ont été identifiés (Bago et al., 1998a,b):

- les spores sur les hyphes extra-racinaires
- les hyphes exploratoires
- les hyphes hyper-ramifiées ou appelées communément BAS pour « *branching arbuscular structure* »

Les hyphes exploratoires sont des hyphes épaisses, droites et peu ramifiées. Elles prolifèrent rapidement par divisions dichotomiques, permettent d'explorer un important volume de sol loin des racines et de coloniser d'autres racines. Sur ces hyphes sont localisées les BAS ayant une structure similaire aux arbuscules. Leur forme ramifiée constituerait une surface d'échanges accrus avec le milieu extérieur comme le font les arbuscules (revue de Juge et al., 2009) et ces BAS pourraient donc être impliquées dans le prélèvement des nutriments et les apporter à la plante, en échange d'éléments carbonés apportés par l'hôte végétal. Ainsi, la symbiose mycorhizienne à arbuscules constitue une association apportant de nombreux bénéfices à chacun des partenaires.

## **II. Impact des polluants sur les principaux stades de développement des CMA**

De nombreux travaux ont montré que les principaux stades du cycle de développement des CMA pouvaient être entravés par la présence de différents types de polluants accumulés

dans les sols (Tableau 1). Plusieurs auteurs ont montré que les taux de germination et l'élongation hyphale sont affectés par la présence de divers polluants tels que les éléments traces métalliques (ETM) (Weissenhorn et al., 1993, 1994; Weissenhorn et Leyval, 1995; Shalaby, 2003; Pawlowska et Charvat, 2004), les fongicides (Venedikian et al., 1999; Zocco et al., 2008; Calonne et al., 2010) et les HAPs (Alarcón et al., 2006; Thomir, 2006; Verdin et al., 2006; Franco-Ramírez et al., 2007; Leduc, 2007; Coppey, 2011). Ces différentes études ont signalé une modification de l'architecture hyphale des spores de divers espèces de CMA en germination, notamment en présence des polluants organiques persistants tels que les HAPs et certains fongicides. Alors que dans un milieu favorable (sans polluant), les spores ont tendance à germer majoritairement de façon ramifiée, elles adoptent un mode de germination linéaire dans un milieu défavorable (avec polluants), limitant ainsi le contact direct avec les polluants. Les mécanismes impliqués dans cette perturbation de la ramification des hyphes des spores de CMA par les polluants ne sont pas encore connus. Ces effets négatifs des polluants sur cette phase asymbiotique diminuent les possibilités de contact des CMA avec les racines hôtes. Ce qui pourrait potentiellement avoir une incidence négative sur la capacité de colonisation racinaire des CMA, et *in fine* sur l'établissement de la symbiose mycorhizienne et la propagation des spores dans les sols pollués. En effet, plusieurs auteurs ont observé des chutes significatives dans les taux de mycorhization totale et arbusculaire en présence de divers polluants aussi bien sur des cultures *in vitro* que dans le sol (Dodd et Jeffries, 1989; Weissenhorn et Leyval, 1995; Leyval et Binet, 1998; Venedikian et al., 1999; Chiocchio et al., 2000; Gaspar et al., 2002; Chen et al., 2004; Liu et al., 2004; Verdin et al., 2006; Debiane et al., 2008, 2009). Enfin, il a été rapporté que la densité des hyphes et des spores ainsi que la diversité des espèces de CMA dans les sols pollués par les ETM comme le plomb (Pb), le cadmium (Cd) et le zinc (Zn) est fréquemment plus faible que dans les sols non pollués (Pawlowska et al., 1996; Del Val et al., 1999; Regvar et al., 2001; Pawlowska et Charvat, 2004). De même, il a été montré, grâce à l'utilisation des cultures monoxéniques, que des polluants organiques comme les HAPs (Verdin et al., 2006, Debiane et al., 2008, 2009) et les fongicides (Campagnac et al., 2008, 2009; Zocco et al., 2008, Calonne et al., 2010, 2012) pouvaient également inhiber le développement extra-racinaire des CMA (longueur des hyphes extra-racinaires et taux de sporulation).



Synthèse bibliographique  
Partie 1: Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

Type de polluant	Polluant	CMA	Culture	Stade de développement affecté					Référence
				Germination des spores	Elongation des hyphes germinatives	Colonisation intra-racinaire	Elongation hyphale extra-racinaire	Sporulation	
ETM	Cadmium	<i>Glomus intraradices</i> DAOM 197198 <i>Glomus etunicatum</i> <i>Glomus mosseae</i> <i>Glomus</i> spp. non identifié	En pot (pollution artificielle) <i>In vitro</i>	X	X	X	X	X	Weissenhorn et al., 1993, 1994; Weissenhorn et Leyval, 1995; Shalaby, 2003 Pawlowska et Charvat, 2004
	Plomb	<i>Glomus intraradices</i> DAOM 197198 <i>Glomus etunicatum</i> <i>Glomus</i> spp. non identifié	<i>In vitro</i>	X	X				Shalaby, 2003; Pawlowska et Charvat, 2004
	Zinc	<i>Glomus intraradices</i> DAOM 197198 <i>Glomus etunicatum</i> <i>Glomus caledonium</i> <i>Glomus</i> spp. non identifié	<i>In vitro</i> En pot (pollution artificielle)	X	X	X			Shalaby, 2003 Chen et al., 2004; Pawlowska et Charvat, 2004
	Mélange d'ETM	<i>Glomus mosseae</i> <i>Glomus claroideum</i> <i>Glomus</i> sp.	<i>In vitro</i> <i>In situ</i> En pot (pollution artificielle et historique)	X	X			X (richesse et diversité)	Weissenhorn et al., 1993; Pawlowska et al., 1996; Del Val et al., 1999; Regvar et al., 2001
Fongicides	Bénomyl	<i>Glomus mosseae</i>	<i>In vitro</i>	X	X				Chiocchio et al., 2000
	Carbendazim	<i>Glomus mosseae</i> <i>Glomus monosporum</i> <i>Glomus etunicatum</i>	<i>In vitro</i> En pot (pollution artificielle)	X	X	X		X	Dodd et Jeffries, 1989 Venedikian et al., 1999
	Chlorothalonil	<i>Glomus mosseae</i>	<i>In vitro</i>	X	X				Venedikian et al., 1999
	Ethirimol	<i>Glomus monosporum</i> <i>Glomus mosseae</i>	En pot (pollution artificielle)			X		X	Dodd et Jeffries, 1989

Synthèse bibliographique  
Partie 1: Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

	Fenhexamid	<i>Glomus intraradices</i> DAOM 197198	<i>In vitro</i>	X	X	X	X	X	Campagnac et al., 2008; Zocco et al., 2008
	Fenpropimorphe			X	X	X	X	X	
	Propiconazole			X	X	X	X	X	Calonne et al., 2010 Calonne et al., 2012
	Propiconazole 12.5% + tridemorph 25%	<i>Glomus mosseae</i> <i>Glomus monosporum</i> <i>Glomus geosporum</i>	En pot (pollution Artificielle)	X		X			Dodd et Jeffries, 1989
	prochloraz	<i>Glomus mosseae</i> <i>Glomus monosporum</i> <i>Glomus geosporum</i>				X		X	
	tridemorph	<i>Glomus geosporum</i>		X					
<b>HAPs</b>	naphtalène	<i>Glomus intraradices</i> DAOM 197198	<i>In vitro</i>	X					Thomir, 2006
	fluorène			X					
	anthracene	<i>Glomus intraradices</i> DAOM 197198 <i>Glomus lamellosum</i> <i>Glomus proliferum</i>	<i>In vitro</i>	X	X	X	X	X	Thomir, 2006; Verdin et al., 2006; Leduc, 2007; Debiane et al., 2008, 2011; Coppey, 2011
	phénanthrène	<i>Glomus geosporum</i> <i>Gigaspora margarita</i> <i>Glomus intraradices</i> DAOM 197198	<i>In vitro</i> En pot (pollution artificielle)	X	X	X			Gaspar et al., 2002; Alarcón et al., 2006; Thomir, 2006; Franco-Ramírez et al., 2007
	fluoranthène	<i>Glomus intraradices</i> DAOM 197198	<i>In vitro</i>	X					Thomir, 2006
	chrysène			X					
	Pyrène			X					
	Benzo[a]anthracène			X					
	B[a]P	<i>Glomus caledonium</i> <i>Gigaspora margarita</i> <i>Glomus intraradices/irregularare</i> DAOM 197198	<i>In vitro</i> En pot (pollution artificielle)	X	X	X	X	X	Liu et al., 2004; Alarcón et al., 2006; Thomir, 2006; Franco-Ramírez et al., 2007; Debiane et al., 2009, 2011; Coppey, 2011
	Coronène	<i>Glomus intraradices</i> DAOM 197198	<i>In vitro</i>	X					Thomir, 2006
Mélange de HAPs	<i>Glomus mosseae</i>	En pot (pollution historique)			X			Leyval et Binet, 1998	

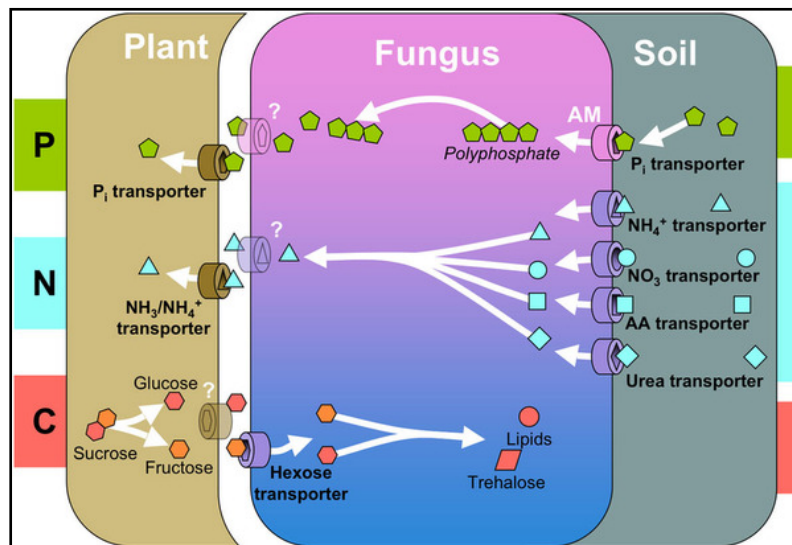
**Tableau 1:** Tableau récapitulatif des travaux décrivant l'impact de divers polluants sur les différentes étapes du cycle de développement des CMA.



# Bénéfices de la symbiose mycorhizienne à arbuscules

L'interaction mycorhizienne se caractérise par un transfert bi-directionnel de nutriments. Les CMA, en échange du carbone fourni par la plante, améliorent la nutrition hydrique et minérale de la plante, notamment en phosphore (P) et en azote (N) (Figure 13). Ces échanges nutritionnels réciproques sont au centre de l'association mycorhizienne et agissent en tant que composants régulateurs assurant le bon fonctionnement de la symbiose (Jakobsen, 1995; Fitter, 2006; revue de Javot et al., 2007a).

Cependant, malgré les nombreux travaux menés sur le transport de nutriments entre les deux symbiotes, les gènes, les transporteurs et les enzymes impliqués dans ces processus ne sont toujours pas clairement identifiés à ce jour (Figure 13).



**Figure 13:** Schéma récapitulant les principaux processus d'échanges de nutriments [phosphore (P), azote (N) et carbone (C)] dans l'ensemble des symbioses mycorhiziennes. Les interfaces entre les trois compartiments sol, champignon et racine sont représentés. Le P inorganique (Pi) et les formes d'N organique ou inorganique, telles que le NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et les acides aminés (AA), sont prélevés dans le sol par des transporteurs spécialisés localisés dans le mycélium extra-racinaire. NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et Pi (après hydrolyse des groupements poly-phosphate (Poly-P) chez les CMA) sont importés au niveau de l'interface symbiotique au niveau des arbuscules chez les CMA vers les cellules végétales grâce à des transporteurs spécifiques. Les transporteurs d'hexoses importent le carbone de la plante jusqu'au champignon (d'après Bonfante et Genre, 2010).

Ces échanges trophiques permettent non seulement une meilleure croissance des deux partenaires symbiotiques mais également une meilleure résistance de la plante aux stress environnementaux biotiques et abiotiques.

## **I. Bénéfices apportés au CMA**

Le CMA étant hétérotrophe pour le carbone, les substances carbonées nécessaires à ses besoins énergétiques proviennent de la plante. Les premières expériences démontrant ce flux de carbone de la plante hôte vers le CMA datent des années 70, où une accumulation de  $^{14}\text{C}$  dans les spores et le mycélium extra-racinaire de CMA provenant de la plante hôte exposée à du  $^{14}\text{CO}_2$  marqué a été observée (Ho et Trappe, 1973; Bevedge et al., 1975; Lösel et Cooper, 1979). D'ailleurs, afin de compléter son cycle de développement, le CMA consomme entre 4 et 20% du carbone assimilé par la plante hôte lors de la photosynthèse (Wright et al., 1998). Ces auteurs ont montré une assimilation supérieure de photosynthétats chez les plantes mycorhizées, ce gain pouvant servir à la croissance du champignon.

Afin de fournir les racines mycorhizées en hexoses, le carbone fixé lors de la photosynthèse est transporté jusqu'aux racines sous la forme de saccharose et de monosaccharide. L'accumulation d'un transcrit d'un transporteur d'hexose, Mtst1, chez *Medicago truncatula* dans les cellules colonisées (Harrison, 1996) suggère un transport actif d'hexoses à l'intérieur et/ou à l'extérieur des cellules colonisées *via* un gradient  $\text{H}^+$ , généré par les  $\text{H}^+$ -ATPases localisées sur la membrane plasmique, induites par la mycorhization (Marx et al., 1982; Gianinazzi-Pearson et al., 1991; Ferrol et al., 2002; Krajinski et al., 2002; Schaarschmidt et al., 2007a). Les hexoses seraient ensuite transportés à travers la membrane plasmique végétale jusque l'interface symbiotique *via* un transport passif (Schaarschmidt et al., 2007b).

Avant transport à travers la membrane plasmique végétale, le saccharose doit être clivé par les invertases induisant la production de glucose et de fructose. Trois types d'invertases sont distinguées: les invertases alcalines solubles, associées au cytoplasme, les invertases acides solubles résidant dans la vacuole et les invertases acides de l'apoplasme, liées à la paroi (revue de Roitsch et González, 2004). L'activité enzymatique des invertases acides liées à la paroi et cytoplasmique ainsi que la saccharose synthétase augmente dans les racines mycorhizées (Wright et al., 1998; Schubert et al., 2003). De plus, l'expression du gène *LIN6* codant pour une invertase apoplasmique extracellulaire est induit dans les cellules colonisées et près des hyphes fongiques (Schaarschmidt et al., 2006).

Comme nous le développerons ultérieurement dans la partie décrivant le métabolisme des lipides chez les CMA (partie II.2.), le carbone, prélevé par le mycélium intra-racinaire du

CMA, est métabolisé en glucides et en lipides (Shachar-Hill et al., 1995; Solaiman et Saito, 1997; Pfeffer et al., 1997, 1999).

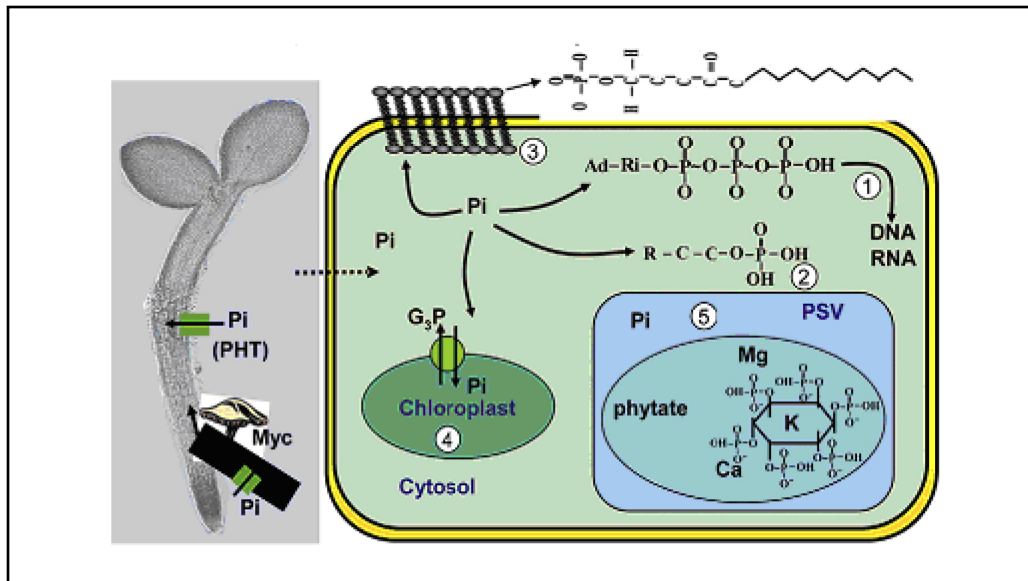
Le premier transporteur connu chez les Glomeromycètes a été identifié chez *Geosyphon pyriformis*. Localisé sur la membrane plasmique, MST1 (pour *monosaccharide transporter 1*) permettrait le transport des hexoses, préférentiellement sous la forme de glucose et de mannose, suivi du galactose, du fructose et probablement du xylose, grâce à un co-transport de protons H<sup>+</sup> (Schüßler et al., 2006, 2007). Récemment, les travaux de Helber et al. (2011) ont montré qu'un gène fongique (*GiSUC1*) possède une forte similarité avec la séquence d'un transporteur de saccharose alors que celui-ci n'est généralement pas considéré comme étant prélevé par le mycosymbiote (revue de Doidy et al., 2012). D'autre part, le gène *MST2* est hautement exprimé durant la symbiose et à peine détecté durant les autres phases du cycle de développement du CMA chez *Glomus* sp. DAOM 197198, indiquant que ce transporteur pourrait être impliqué dans le prélèvement de glucides provenant de la plante (Helber et al., 2011). Ce transporteur MST2 est capable de déplacer préférentiellement le glucose, suivi du xylose, du mannose et du fructose. En revanche, il est incapable de transporter les disaccharides (Helber et al., 2011). Ces auteurs ont également démontré que ce gène était exprimé non seulement dans les arbuscules mais également dans les hyphes intercellulaires, suggérant que ces structures soient également le site de prélèvement du glucide, comme observé précédemment dans l'épiderme et l'hypoderme des structures fongiques par Manjarrez et al. (2008).

## **II. Bénéfices apportés à la plante**

Le rôle majeur des CMA est l'amélioration des nutritons hydrique et minérale de la plante. Il en résulte une amélioration de la croissance des plantes mycorhizées (Plenchette et al., 1983; Karagiannidis et Hadjisavva-Zinoviadi, 1998; Karandashov et Bucher, 2005; Sharifi et al., 2007; Sheng et al., 2008; Zuccarini et Okurowska, 2008). En effet, l'élongation des hyphes extra-racinaires augmente la surface de contact entre les minéraux du sol et la racine et il est estimé que la longueur des hyphes peut atteindre 81 à 111 m par cm<sup>3</sup> de sol (Miller et al., 1995). De plus, ils peuvent explorer des zones non accessibles pour les plantes non-mycorhizées pour y prélever l'eau et les nutriments et les transférer à la plante hôte (Marulanda et al., 2003; Bolandnazar et al., 2007; Khalvati et al., 2008).

## II.1. Transfert du Phosphore (P) du CMA à la plante

La plupart des sols contiennent de grandes quantités de P organique ou inorganique (Sanyal et De Datta, 1991), la quantité étant estimée entre 200 et 3 000 mg/kg de sol (revue de Harrison, 1987). La majeure partie du P est le plus souvent sous forme d'orthophosphate inorganique adsorbé aux autres constituants cationiques du sol pour former des complexes  $\text{CaPO}_4$  avec le calcium à pH élevé et des complexes  $\text{FePO}_4$  ou  $\text{AlPO}_4$  avec le fer (Fe) ou l'aluminium, à pH faible, ainsi que sous forme de molécules organiques comme la lécithine (Sanyal et De Datta, 1991; revues de Javot et al., 2007a; Richardson et al., 2009; Smith et Smith, 2012). De plus, contrairement à de nombreux autres nutriments minéraux, le P est très peu mobile dans les sols (revue de Javot et al., 2007a). Sous l'action du prélèvement racinaire, il se crée rapidement des zones d'appauvrissement autour des racines. Une faible proportion (généralement inférieure à 1%) est immédiatement disponible pour les plantes, qui ont des difficultés à acquérir cet élément alors que leurs besoins sont grands (Richardson et al., 2009; revue de Smith et al., 2011). En effet, le P est un élément indispensable à la vie de la plante (Figure 14). Ce composé entre dans la synthèse de nombreuses molécules telles que l'adénosine triphosphate (ATP) et des phospho-nucléotides: uridine triphosphate (UTP), Cytidine triphosphate (CTP) et Guanosine triphosphate (GTP); des phospholipides; certaines enzymes et co-enzymes (Marschner, 1995; Gaude et al., 2008; revue de Maathuis, 2009). Le phosphore est également stocké dans les vacuoles sous forme d'inositol-hexa-phosphate appelé aussi les acides phytiques (phytates) qui sont d'excellents chélateurs des cations tels que le  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  (Mitsuhashi et al., 2005). La formation et l'hydrolyse de liaisons pyrophosphates est un mécanisme central dans la régulation de l'énergie cellulaire (revue de Maathuis, 2009).



**Figure 14:** Principales structures cellulaires dans lesquelles le phosphore est incorporé chez les plantes. Le phosphore est absorbé sous la forme inorganique:  $\text{PO}_4^{3-}$  (Pi) grâce à des transporteurs ayant une forte affinité aux ions  $\text{H}^+$ . Le Pi forme les pyrophosphates hautement énergétiques (1) et les liaisons esters (2). Les groupes phosphates forment les composants lipophiles de plusieurs lipides membranaires (3). Le Pi dans les chloroplastes est nécessaire pour la photosynthèse (4). Il passe dans le chloroplaste en échange avec le glycéraldéhyde-3-phosphate ( $\text{G}_3\text{P}$ ). Dans les tissus de stockage (5), le Pi est séquestré dans les vacuoles de stockage des protéines sous forme de phytate lié aux minéraux (d'après Maathuis, 2009).

Ainsi, les plantes ont élaboré diverses stratégies augmentant leur capacité d'absorption du P ou sa disponibilité dans les sols (Marschner, 1995). La première consiste en l'augmentation de l'interface racine/sol afin d'accéder à une plus grande quantité de P directement disponible (Bates et Lynch, 1996). La deuxième stratégie consiste pour la plante à libérer le P des complexes formés avec les cations en sécrétant des molécules comme le malate ou le citrate qui entrent en compétition avec le P ou encore des phosphatases capables de minéraliser le P des composés organiques (revue de Javot et al., 2007a). En plus de ces deux stratégies permettant à la plante de prélever directement le P du sol, une autre stratégie consiste en la voie dite « mycorhizienne », *via* le mycélium extra-racinaire du CMA, étant la méthode de prélèvement du P la plus commune (Karandashov et Bucher, 2005; revue de Smith et al., 2011). D'ailleurs, les cellules végétales contenant des structures mycorhiziennes contiennent une quantité de P supérieure aux autres cellules racinaires (Schoknecht et Hattingh, 1976; Weiersbye et al., 1999). De plus, de nombreux travaux suggèrent que la quantité transférée est supérieure à celle des autres nutriments (Smith et al., 2003, 2004; Harrison et al., 2010). Par ailleurs, la voie mycorhizienne pourrait être essentielle à la survie de certaines plantes ne possédant pas de poils absorbants et dont l'absorption de nutriments serait difficile.



La présence du champignon est essentielle pour explorer le sol à la recherche de cet élément peu mobile afin de satisfaire les besoins nutritionnels de l'hôte végétal. Pour accéder aux pools de P du sol inaccessibles aux plantes, les CMA seraient capables d'hydrolyser le P organique en P inorganique pour le rendre disponible dans le sol à la plante ou encore le transférer directement à la plante hôte (Joner et al., 2000; Koide et Kabir, 2000; Feng et al., 2003; Shibata et Yano, 2003), en échange des glucides provenant de la plante et transférés vers le CMA à travers l'interface mycorhizienne (Bücking et Shachar-Hill, 2005; revue de Parniske, 2008). En effet, il a été montré, grâce à l'utilisation de dispositifs à compartiments et de P marqués  $^{32}\text{P}$  ou  $^{33}\text{P}$  que les hyphes extra-racinaires du champignon sont capables de prélever et de transporter le P jusqu'aux racines (Cooper et Tinker, 1978; Jakobsen et al., 1992; Pearson et Jakobsen, 1993; Cui et Caldwell, 1996; Smith et al., 2003, 2004). De plus, il a été montré que même quand un apport de P est ajouté à la matrice où se développent les racines, les plantes cherchent tout de même à obtenir un transfert de ce P *via* le CMA (Smith et al., 2003, 2004). D'ailleurs, les besoins en P de la plante et le développement fongique sont connus pour être liés, car des niveaux de P conséquents dans le sol réduisent non seulement la croissance fongique à l'intérieur de la racine (Menge et al., 1978; Breuillin et al., 2010) mais aussi le transfert de carbone au CMA (Olsson et al., 2010).

Le prélèvement du P par le mycélium extra-racinaire se fait contre un gradient de concentration. Le processus d'absorption étant énergie dépendante, le P entre dans le cytoplasme *via* des symports  $\text{Pi}/\text{H}^+$  de haute affinité (Harrison et Van Buuren, 1995; Karandashov et Bucher, 2005; revue de Javot et al., 2007a). Trois transporteurs du P ont été identifiés chez les CMA, *GvPT*, *GiPT* et *GmosPT* chez *Glomus versiforme*, *Glomus intraradices* et *Glomus mosseae* respectivement (Harrison et Van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza et al., 2001; Benedetto et al., 2005). Alors que ces gènes sont tous exprimés dans les hyphes extra-racinaires du champignon, *GmosPT* montre également une expression significative dans les hyphes intra-racinaires (Benedetto et al., 2005).

Le P est alors rapidement condensé en polyphosphate (poly-P) (Ezawa et al., 2004). Il a été montré que les poly-P représentent plus de 60% du P total accumulé dans les CMA (Hijikata et al., 2010). Les poly-P sont des polymères constitués de 3 à des milliers de P reliés par des liaisons phospho-anhydrides de haute affinité (Kornberg et al., 1999). Dans le mycélium extra-racinaire des CMA, la longueur moyenne des poly-P atteint 13 à 15 P reliés (Rasmussen et al., 2000; Viereck et al., 2004). La majorité des poly-P ainsi formée est alors stockée dans les compartiments acides, probablement vacuolaires, dans les hyphes extra-racinaires des CMA (Viereck et al., 2004). Les poly-P seraient très majoritairement

transportés dans les hyphes intra-racinaires par un système de vacuoles tubulaires reliées entre elles, tandis qu'une autre partie du transport aurait lieu *via* le courant cytoplasmique (Uetake et al., 2002; revue de Van Aarle et Olsson, 2008).

La longueur des poly-P est inférieure dans les hyphes intra-racinaires par rapport aux hyphes extra-racinaires (Solaiman et al., 1999; Viereck et al., 2004; Ohtomo et Saito, 2005). Cette longueur inférieure semble confirmer l'hydrolyse active des poly-P dans les hyphes intra-racinaires dans le but de produire des orthophosphates pouvant être libérés dans l'apoplasme au niveau de l'interface plante/CMA (Ezawa et al., 2001). Le mécanisme exact de l'hydrolyse des groupements poly-P n'est pas entièrement connu. Cependant l'intense activité enzymatique des phosphatases près des arbuscules par rapport aux autres structures intra-racinaires semble indiquer un rôle de ces enzymes dans cette fonction (Tisserant et al., 1993; Ezawa et al., 1995; Van Aarle et al., 2005)

Les CMA présentent de fortes activités phosphatases alcalines et acides dans les hyphes intra- et extra-racinaires (Smith et Gianinazzi-Pearson, 1990; Ezawa et al., 2001; Van Aarle et al., 2001, 2002; Olsson et al., 2002) mais il semble que les CMA n'excrètent pas beaucoup de phosphatases (Joner et al., 2000), contrairement aux racines. Dans le mycélium extra-racinaire de *Glomus intraradices* BEG87 et *Glomus claroideum* BEG14, il a été montré qu'une partie des phosphatases étaient associées à la paroi fongique alors qu'une autre partie était associée aux structures internes (Joner et Johansen, 2000; Olsson et al., 2002). Il a ainsi été suggéré que les phosphatases pourraient en partie jouer un rôle d'aide au prélèvement dans les structures extra-racinaires des CMA (revue de Van Aarle et Olsson, 2008).

D'autre part, les activités phosphatases alcalines et acides sont toujours plus élevées dans le mycélium intra-racinaire, comme montré chez *Gigaspora margarita*, que dans le mycélium extra-racinaire (Van Aarle et al., 2002), ce qui semble indiquer une fois de plus leur implication dans l'hydrolyse des groupements poly-P.

Les travaux de Labidi et al. (2012) ont montré que les racines de chicorée non-mycorhizées cultivées *in vitro* présentaient des activités phosphatases alcalines identique aux racines colonisées par *Rhizophagus irregularis*, contrairement à l'affirmation selon laquelle les phosphatases alcalines auraient une origine fongique (Kojima et al., 1998).

Chez les CMA, de nombreux travaux ont montré que les activités des phosphatases alcalines étaient plus élevées que les activités des phosphatases acides dans le mycélium extra-racinaire tandis que le contraire était observable dans les structures fongiques intra-racinaires de *Gigaspora margarita* et *Glomus intraradices* BEG87 (Olsson et al., 2002; Van

Aarle et al., 2002, 2005). Cependant, de fortes activités phosphatases alcalines ont été détectées dans les hyphes intra-racinaires de *Gigaspora margarita* (Kohjima et Saito, 2004). De même, deux gènes codant pour des phosphatases alcalines fongiques (*GiALP* et *GmALP*) ont été identifiés chez *Glomus intraradices* et *Gigaspora margarita* respectivement dans le mycélium intra- et extra-racinaire (Aono et al., 2004). Il a également été démontré que l'expression de ces gènes codant pour des phosphatases alcalines était supérieure dans les hyphes intra-racinaires que dans les hyphes extra-racinaires, suggérant leur implication dans le métabolisme des poly-P dans les hyphes intra-racinaires plus que dans le prélèvement des nutriments dans la rhizosphère (Aono et al., 2004). Cependant le substrat de ces enzymes ne semble pas spécifique. En effet, l'analyse des activités phosphatases alcalines dans les fractions solubles et insolubles de *Glomus etunicatum* en présence de différents substrats et en présence d'un inhibiteur de l'activité (le béryllium) a montré leur implication dans le métabolisme glucidique chez les CMA. Le glucose-6-phosphate et le  $\beta$ -glycerophosphate étaient hydrolysés plus efficacement que les poly-P par ces enzymes (Ezawa et al., 1999).

Dans les hyphes intra-racinaires de *Gigaspora margarita* extraites à partir de racines de *Allium cepa*, la proportion des phosphatases acides actives dans le mycélium et les arbuscules est négativement corrélée avec la teneur en P dans les parties aériennes, dans des conditions de faible disponibilité en P dans le milieu, tandis que cette corrélation n'est pas retrouvée avec les phosphatases alcalines (Van Aarle et al., 2002).

De plus, les phosphatases alcalines (dont l'activité est plus importante dans le mycélium extra-racinaire) ont une affinité avec les longues chaînes de poly-P. En revanche, une plus grande affinité des activités phosphatases acides pour les courtes chaînes de poly-P les hyphes intra-racinaires (Ezawa et al., 2001) en concomitance avec raccourcissement des poly-P, semble suggérer que ces phosphatases acides seraient impliquées plus spécifiquement dans l'hydrolyse des poly-P vacuolaires pour transférer le P à la plante au niveau de l'interface plante-CMA que les phosphatases alcalines.

Enfin, les mécanismes induits dans le prélèvement du phosphore par les cellules végétales ne sont pas encore entièrement connus (revue de Javot et al., 2007a). Il semblerait que les ions phosphate traversent l'interface symbiotique selon un gradient de concentration (transport passif). Leur transfert par cette interface serait facilité par des canaux ioniques spécifiques. Cependant, les travaux de Balestrini et al. (2007) ont montré que *GmosPT* était exprimé uniquement dans les cellules racinaires de *Lycopersicon esculentum* colonisées par

*Glomus mosseae*. Ces résultats semblent indiquer le rôle de ce transporteur de P fongique dans le transfert de ce P dans le compartiment apoplasmique péri-arbusculaire.

Une fois le P libéré, il serait prélevé par les cellules corticales de la plante *via* des transporteurs de phosphore de la plante (transport actif), tel que le transporteur PT4 codé par le gène *MtPT4* identifié chez *Medicago truncatula* dans les cellules racinaires colonisées par le CMA (Javot et al., 2007b).

## II.2. Transfert de l'azote (N) du CMA à la plante

Comme le P, l'N est un composant vital pour le CMA et la plante. Il entre dans la formation des phospholipides, des coenzymes et des acides aminés.

Le prélèvement et le transport de l'N du CMA a été montré durant l'exposition des hyphes extra-racinaires du CMA au  $^{15}\text{NO}_3^-$  ou au  $^{15}\text{NH}_4^+$  marqués. Les hyphes et les racines étaient alors hautement marqués, suggérant le transfert de l'N du CMA vers les racines (Govindarajulu et al., 2005).

L'azote est présent sous deux formes dans le sol: organique et minérale (nitrites, nitrates et ions ammonium). Le mycélium du CMA est capable de prélever l'N sous forme d'ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (Johansen et al., 1996), sous forme de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) (Bago et al., 1996; Johansen et al., 1996) et sous forme d'acides aminés (Hawkins et al., 2000), avec une nette préférence pour les ions  $\text{NH}_4^+$  (López-Pedrosa et al., 2006). Il peut également accélérer la dégradation de la matière organique afin d'en augmenter la biodisponibilité pour les plantes (Hodges et al., 2001).

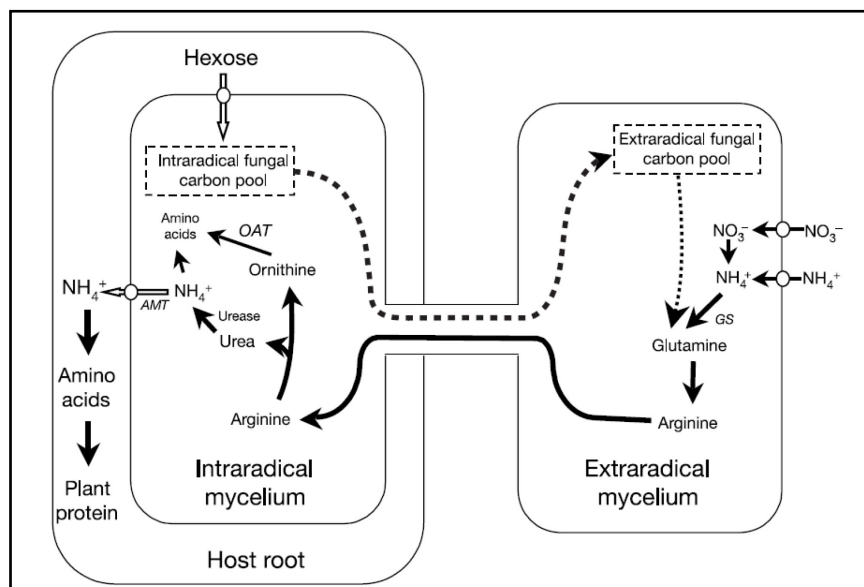
L'acquisition de l'N nécessite l'activité de transporteurs localisés au niveau de l'interface sol/hyphes extra-racinaires du CMA. Récemment, deux gènes codant pour des transporteurs de l'N ont été identifiés chez les CMA, *GintAMT1* et *GintAMT2* codant pour des transporteurs de haute-affinité aux ions  $\text{NH}_4^+$  chez *Glomus intraradices* DAOM 197198 (López-Pedrosa et al., 2006, Pérez-Tienda et al., 2011). *GintAMT1* est préférentiellement exprimé dans le mycélium extra-racinaire quand l'N est présent à une faible molarité dans le milieu environnant le mycélium et plus faiblement dans les arbuscules, suggérant que ce gène soit impliqué dans l'acquisition de l'N dans le milieu. En revanche, *GintAMT2* serait impliqué dans la rétention et la récupération des ions  $\text{NH}_4^+$  pour les besoins des CMA en N (Pérez-Tienda et al., 2011).

Le cycle de la glutamine synthétase/glutamate synthétase (GS/GOGAT) serait également potentiellement impliqué dans l'assimilation des ions  $\text{NH}_4^+$  dans les hyphes extraracinaires (Johansen et al., 1996; Breuninger et al., 2004) bien que l'implication de la glutamate deshydrogénase ne soit pas expérimentalement exclue à ce jour (revue de Bonfante et al., 2009).

Une fois prélevé, l'N est transporté jusque dans les hyphes intra-racinaires sous forme d'arginine, acide aminé prédominant dans les hyphes extra-racinaires (Jin et al., 2005). Une fois dans les hyphes intra-racinaires, l'arginine serait hydrolysée par le cycle de l'urée afin de transférer l'N à la plante. En effet, Govindarajulu et al. (2005) ont démontré une plus forte expression de gènes codant pour une ornithine aminotransférase, une protéine uréase accessoire et un transporteur d'ammonium dans le mycélium intra-racinaire par rapport au mycélium extra-racinaire, ces gènes étant impliqués dans l'hydrolyse de l'arginine et dans le transfert de l'N. Il est supposé que l'N soit transférée à la plante préférentiellement sous la forme de  $\text{NH}_4^+$  et que le squelette carboné issu de l'hydrolyse de l'arginine soit réintégré dans le pool de carbone du CMA (Govindarajulu et al., 2005; Cruz et al., 2007).

Dans les racines, un transporteur d'ammonium (AMT) a récemment été identifié chez *Lotus japonicus*, dans les cellules contenant les arbuscules (Guether et al., 2009a,b) et la régulation d'un transporteur d'ammonium chez *Medicago truncatula* a également été démontrée (Gomez et al., 2009).

L'acquisition de l'N par le mycélium extra-racinaire et son transfert à la plante est résumé dans la figure 15.



**Figure 15:** Schéma récapitulant le mouvement de l'N dans la symbiose mycorhizienne à arbuscules (d'après Govindarajulu et al., 2005).

### II.3. Transfert d'oligo-éléments du CMA à la plante

Le transfert des oligo-éléments à la plante par le CMA est beaucoup moins étudié que le transfert du P ou de l'N. Ces oligo-éléments jouent cependant des rôles dans des activités enzymatiques intervenant dans la photosynthèse, la respiration oxydative, la protection contre les radicaux libres ou encore la biosynthèse des lipides (Fraústro Da Silva et Williams, 2001).

Il est connu que le CMA permet une meilleure absorption d'oligo-éléments peu mobiles dans les sols, tels que le cuivre (Cu), le Zn, le Fe, le manganèse (Mn) et le cobalt (Co). En effet, deux fois plus de Zn, Fe et Mn et trois fois plus de Cu sont mesurés chez les plantes d'arachides inoculées par *Glomus fasciculatum* (Krishna et Bagyaraj, 1984). Cette tendance à l'augmentation de la concentration du Zn, Cu et Fe dans les parties aériennes de maïs colonisé par *Glomus intraradices* par rapport aux plantes non-mycorhizées a également été observée quand ces micro-éléments étaient présents en faibles quantités dans le sol (Liu et al., 2000).

Cependant, lorsque ces éléments sont présents en fortes quantités et possèdent de ce fait un caractère polluant, les mycorhizes peuvent jouer un rôle de protection de la plante, par une forte rétention de ces éléments toxiques (Liu et al., 2000). Cet aspect sera développé dans le paragraphe résistance des plantes aux stress abiotiques (partie II.4.3).

### II.4. Autres bénéfices apportés aux plantes par la colonisation mycorhizienne arbusculaire

#### II.4.1. Effet sur la structure du sol

Les hyphes du CMA étant présents en quantité importante dans les sols, entre 81 et 111 m par cm<sup>3</sup> de sol (Miller et al., 1995), ils possèdent la propriété d'agir sur la macroaggrégation des constituants du sol et donc sur sa stabilité (Tisdall, 1991). En effet, ces hyphes produisent des polysaccharides extracellulaires auxquels des microaggrégats (d'un diamètre inférieur à 250 µm) sont attachés pour former des macroaggrégats stables (supérieur à 250 µm) (Tisdall, 1994). Ces polysaccharides seraient en fait une glycoprotéine: la glomaline (Wright et Upadhyaya, 1998) dont la concentration dans les sols dépend de la plante hôte et du champignon associé (Rillig et al., 2002).

Cette stabilité du sol ainsi produite permet de lutter contre l'érosion, la perte de nutriments et de la matière organique par lixiviation, qui entraînent une baisse de productivité en agriculture (Schreiner et Bethlenfalvay, 1995).

#### II.4.2. Résistance aux stress biotiques

L'atténuation des dommages causés par des organismes phytopathogènes a été démontrée dans de nombreux travaux chez les racines des plantes mycorhizées par rapport aux plantes non-mycorhizées. En effet, les CMA semblent réduire l'incidence et/ou la sévérité des effets délétères causés par des champignons phytopathogènes racinaires tels que *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Phytophthora*, *Pythium* et *Aphanomyces* (revues de St-Arnaud et al., 1995; Whipps, 2004), des bactéries telles que *Xanthomonas campestris* (Liu et al., 2007). De plus, la protection conférée serait non seulement locale mais aussi systémique. Cela a été démontré chez la tomate et l'orge colonisés par *Glomus mosseae* contre *Phytophthora parasitica* et *Gaeumannomyces graminis* et par *Glomus versiforme* contre *Ralstonia solanacearum* (Cordier et al., 1998; Pozo et al., 2002; Zhu et Yao, 2004; Khaosaad et al., 2007) et chez la tomate avec *Glomus mosseae* contre les nématodes *Meloidogyne incognita* et *Pratylenchus penetrans* (Vos et al., 2012).

Cette protection apportée par la colonisation mycorhizienne résulterait d'une combinaison de cinq principaux mécanismes d'action:

- La stimulation de la croissance de la plante par une meilleure nutrition, une meilleure santé végétale et la compensation par la symbiose des dommages causés par l'agent phytopathogène (revues de Whipps, 2004; Dalpé, 2005; Pozo et al., 2009; Wehner et al., 2010).
- La compétition directe ou indirecte entre les CMA et les organismes phytopathogènes, liées à la disponibilité des nutriments, notamment des photosynthétats, et des sites d'infection sur la racine (Cordier et al., 1998; revues de Whipps, 2004; Dalpé, 2005; Pozo et al., 2009; Wehner et al., 2010).
- La transformation morphologique et architecturale de la racine, ce qui peut altérer la dynamique infectieuse du pathogène, bien que la preuve d'une corrélation ne soit pas mise en évidence à ce jour (revues de Whipps, 2004; Dalpé, 2005; Pozo et al., 2009; Wehner et al., 2010). La déposition de callose et de pectines et l'activation de la voie des phénylpropanoïdes résultant en l'accumulation de lignine chez les plantes

mycorhizées seraient impliquées dans la protection de la plante (Matsubara et al., 1995; revue de Pozo et al., 2002; Lee et al., 2005). De plus, les CMA induisent la formation des racines latérales plus épaisses (Matsubara et al., 1995).

- La modification de la microflore et de l'augmentation du taux de matière organique dans les sols. Ces changements peuvent mener à la stimulation de la production de composés par la microflore avec une activité antagoniste vers certains pathogènes racinaires (Barea et al., 2005; revues de Dalpé, 2005; Pozo et al., 2009; Wehner et al., 2010). Les travaux de Siasou et al. (2009) ont montré que les variétés de *Pseudomonas fluorescens* rhizosphériques, qui produisent l'antibiotique 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) conférant une protection chez les plantes contre *Gaeumannomyces graminis*, produisent de plus grandes quantité de DAPG en présence de carbone soluble d'un sol contenant *Glomus intraradices*.
- L'induction ou la suppression de certains mécanismes de défense des plantes, notamment les mécanismes enzymatiques (revues de Dalpé, 2005; Pozo et Azcón-Aguilar, 2007; Pozo et al., 2009; Wehner et al., 2010). En effet, la protection par mycorhization contre les parasites racinaires a été associée à l'accumulation de phénols, de ERO, de phytoalexines et l'induction de l'activité d'isoformes spécifiques d'enzymes hydrolytiques comme les chitinases et les  $\beta$ -1,3-glucanases dans les racines mycorhizées (Cordier et al., 1998; Dumas-Gaudot et al., 2000; Pozo et al., 1999, 2002, 2009; Yao et al., 2003; Zhu et Yao, 2004; Li et al., 2006). La protection conférée par l'association mycorhizienne à la plante contre *Meloidogyne incognita* a été associée à l'expression d'un gène codant pour une chitinase, *VCH3*, exprimé dans tout le système racinaire (Li et al., 2006). Enfin, l'accumulation de protéines de défense, notamment des protéines PR (pour « *Pathogenis Related* ») et l'implication des voies de signalisation de l'acide jasmonique, de l'éthylène et l'acide salicylique, connus pour jouer un rôle majeur dans la régulation des mécanismes de défense des plantes, semblent être à l'origine de ces processus de protection (revue de Van Wees et al., 2008).

Contrairement aux maladies racinaires, peu de travaux ont été menés sur la protection conférée par les CMA sur les maladies foliaires et les résultats sont moins concluants et contradictoires (revue de Whipps, 2004). Une meilleure tolérance contre les champignons responsables de l'oïdium (*Blumeria* sp. et *Bremia lactucae*), de la rouille (*Uromyces*) et de la pourriture grise (*Botrytis cinerea*) a été décrite chez des plantes mycorhizées (revue de Whipps, 2004; Jung et al., 2009; Moller et al., 2009). Un retard dans la progression de la



maladie provoqué par *Phytophthora infestans* a également été observé sur des plants de pomme de terre colonisés par un inoculum mycorhizien commercial, (O'Herlihy et al., 2003). La résistance des plantes a également été augmentée chez les plantes mycorhizées contre les agents pathogènes nécrotrophes tels que *Alternaria solani* (Fritz et al., 2006, De La Noval et al., 2007). Cet effet est, toutefois, controversé chez les champignons hémi-biotrophes tel que *Colletotrichum orbiculare*. Lee et al. (2005) ont observé une diminution de l'antracnose sur les feuilles de plants de concombre colonisés par *Glomus intraradices*, alors qu'aucun effet n'a été observé sur les plants de concombre mycorhizés par *Glomus mosseae* (Chandanie et al., 2006).

Cependant, si l'induction des réactions de défense au niveau du système racinaire des plants mycorhizés a été clairement mise en évidence depuis longtemps, ces mécanismes n'ont été signalés que récemment dans les feuilles des plants mycorhizés (Liu et al., 2007; revue de Pozo et al., 2009). Jung et al. (2009) ont démontré que la résistance systémique induite conférée par *Glomus mosseae* contre *Botrytis cinerea* dans les feuilles de tomate est associée à une induction d'un gène de référence (*Pin II*), codant pour un inhibiteur de protéase, dans les plantes mycorhizées. Ces résultats indiquent que la résistance induite par les mycorhizes contre *Botrytis cinerea* pourrait être associée à une induction de la voie de signalisation de l'acide jasmonique (priming). Dans une étude récente, Gallou et al. (2011) ont révélé par qRT-PCR, l'induction de l'expression de deux gènes codant pour des PR-protéines (*PR1* et *PR2*) dans les feuilles de plants de pomme de terre mycorhizés, cultivés *in vitro*, peu de temps après leur infection par *Phytophthora infestans* suggérant une résistance systémique induite grâce à la mycorhization par *Glomus* sp.

#### II.4.3. Résistance aux stress abiotiques

A côté de la protection des plantes par la colonisation mycorhizienne vis-à-vis des stress biotiques, de nombreux travaux ont également décrit l'effet protecteur apporté par la mycorhization contre les stress abiotiques tels que la sécheresse, la salinité et la pollution. Cependant, les processus impliqués dans cette tolérance ne sont pas encore complètement élucidés.

- Stress hydrique

Il a été démontré que la colonisation mycorhizienne améliore la croissance des plants de citron sous l'effet de la sécheresse indirectement en affectant le taux de rétention d'eau

dans le sol *via* l'effet de la glomaline, sans exclure pour autant un effet direct sur la nutrition minérale (Wu et al., 2008). En effet, le mycélium pouvant explorer un volume de sol beaucoup plus important que les racines et ayant accès à un réservoir hydrique plus important, il peut ainsi aider au maintien de l'équilibre hydrique et minéral de la plante. La tolérance des plantes mycorhizées à la sécheresse serait donc attribuée à un ensemble de processus physiologiques dont une meilleure nutrition minérale (en particulier P et N) et hydrique, ce qui améliore la photosynthèse, la transpiration et accroît le développement de la plante (Ruiz-Lozano et al., 1995; revue de Augé, 2001). La colonisation mycorhizienne induit également l'augmentation de la conductivité hydraulique de la plante hôte dans des conditions de stress osmotique et une meilleure régulation des niveaux de l'acide abscissique et par conséquent un meilleur taux de transpiration (Sánchez-Blanco et al., 2004; Aroca et al., 2007, 2008). Ces améliorations semblent être liées à l'atténuation du stress oxydant, se traduisant par la production d'enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutase, catalase et guaiacol-peroxydase) et d'anti-oxydants non enzymatiques (ascorbate et glutathion) (Wu et Zou, 2008; Ruiz-Sánchez et al., 2010).

Au niveau moléculaire, deux gènes pouvant avoir un lien avec la tolérance des plantes au stress induit par la sécheresse ont été identifiés chez les CMA (Porcel et al., 2006, 2007). Les résultats obtenus par ces auteurs démontrent que la contribution des CMA pour augmenter la tolérance à la sécheresse de la plante hôte peut être modulée par un groupe de protéines 14-3-3 fongiques, codées par le gène *Gi14-3-3*, régulant les voies de signalisation, des protéines impliquées dans la réponse de la plante et un groupe de protéines chaperons, codées par le gène *GiBiP*. Les protéines GiBiP faciliteraient la maturation de protéines (sécrétées lors du stress hydrique) impliquées dans le mécanisme de réponse osmotique (Porcel et al., 2007).

- Stress salin

La salinité élevée (en NaCl, NaCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NaSO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ou sels de magnésium) dans les sols peut affecter l'établissement, la croissance et le développement des plantes ainsi que d'importants métabolismes, tels que les métabolismes lipidiques et énergétiques. Il en résulte des effets délétères provoquant d'énormes pertes au niveau de la productivité (Ramoliya et al., 2004; Evelin et al., 2009). D'après la revue de Porcel et al. (2012), les plantes se développant sur un sol salin sont sujettes à trois stress physiologiques distincts. Premièrement, les ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> perturbent la structure des enzymes et d'autres macromolécules, induisent des dommages sur les organites cellulaires, perturbent la photosynthèse et la respiration, inhibent

la synthèse protéique et induisent des déficiences ioniques (Juniper et Abbott, 1993; Apse et Blumwald, 2002; Pitman et Läuchli, 2002). Deuxièmement, les plantes exposées à de fortes concentrations salines peuvent subir un stress hydrique puisque l'eau assimilable par les plantes diminue du fait des fortes concentrations en sel dans les sols (Augé, 2001). D'autre part, les plantes doivent maintenir un potentiel osmotique interne bas afin d'éviter que l'eau ne parte dans le sol par les racines. Enfin, la salinité produit également un déséquilibre nutritif dans la plante causé par des chutes dans l'absorption et/ou le transport des nutriments jusqu'aux parties aériennes (Marschner, 1995; Adiku et al., 2001).

La protection apportée par la colonisation mycorhizienne à la plante contre le stress induit par le NaCl proviendrait de la combinaison d'une meilleure nutrition de la plante résultant d'une augmentation et/ou d'une meilleure sélection dans le prélèvement des nutriments, l'accumulation de composés osmorégulateurs, une importante conductance stomatique, une meilleure transpiration, une augmentation de l'activité photosynthétique ou encore une limitation de la déshydratation des feuilles (Cantrell et Linderman, 2001; Feng et al., 2002; Aroca et al., 2006; Porcel et al., 2006; Sheng et al., 2008). Cependant, l'effet positif sur le développement de la plante dépend des espèces de CMA étudiés (Marulanda et al., 2003, 2007; Wu et al., 2007; revue de Porcel et al., 2012).

Par ailleurs, en condition de stress salin, il semble que l'accumulation de  $K^+$  par les plantes mycorhizées (Hanway et Heidel, 1952; Ojala et al., 1983; Mohammad et al., 2003; Giri et al., 2007) aide au maintien d'un ratio K/Na élevé, prévenant ainsi la perturbation de nombreux processus enzymatiques et l'inhibition de la synthèse protéique (revue de Porcel et al., 2012).

De plus, en cas de salinité élevée, il a été démontré que les plantes mycorhizées accumulaient plus de proline (molécule d'ajustement osmotique), de bêtaïne et des sucres solubles que les plantes non-mycorhizées (Jindal et al., 1993; Porcel et Ruiz-Lozano, 2004; Al-Garni, 2006; Sharifi et al., 2007). Ces molécules sont connues pour protéger les structures subcellulaires, pour maintenir les activités enzymatiques et limiter les dommages oxydants induits par les radicaux libres en cas de stress salin (Yokoi et al., 2002). Enfin, il a été suggéré que la symbiose mycorhizienne à arbuscules diminuerait le stress salin chez les plantes en augmentant l'activité des enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase, l'ascorbate-peroxydase et les activités peroxydasiques. Ces enzymes permettent la dégradation des ERO et par conséquent, limitent l'induction de dommages membranaires (Alguacil et al., 2003; He et al., 2007; Zhong et al., 2007).

- Pollution

- Eléments traces métalliques (ETM)

Les pollutions par les ETM peuvent résulter des activités humaines (Schachtschabel et al., 1992) ou être présents de façon naturelle (gisements miniers) (Jung et Thornton, 1996; Rodríguez et al., 2009). Certains métaux sont nécessaires aux organismes et considérés comme des micronutriments, comme le Zn, le Cu ou le Co à de faibles concentrations. En revanche, l'accumulation de fortes concentrations de ces composés est très toxique puisqu'ils peuvent altérer le niveau d'autres nutriments et induire la production de radicaux libres (Gutteridge et Halliwell, 1989). De plus, d'autres métaux sont toxiques même à de faibles concentrations. Ce sont le mercure, le Pb et le Cd.

Les premiers travaux mettant en évidence un effet protecteur des CMA pour la plante hôte contre la toxicité de fortes concentrations d'ETM ont débuté dans les années 1980. En effet, de nombreux travaux ont démontré une meilleure croissance des plantes mycorhizées se développant sur un milieu contaminé par les ETM (Rivera-Becerril et al., 2002; Repetto et al., 2003; Leyval, 2005; Ouziad et al., 2005; Chen et al., 2007; Hildebrandt et al., 2007). Une accumulation d'ETM inférieure dans les plantes colonisées par des CMA isolées à partir de sols contaminés ou une diminution du transport des métaux des racines vers la parties aériennes peuvent expliquer cet effet protecteur (Diaz et al., 1996; Burke et al., 2000; Davies et al., 2001; Joner et Leyval, 2001; Rivera-Becerril et al., 2002; Chen et al., 2003; Wang et al., 2007). De plus, la protection apportée par ces souches de CMA plus tolérantes aux ETM (Weissenhorn et al., 1993) serait plus importante que celle apportée par des souches provenant de sols non pollués (Gildon et Tinker, 1983; Hildebrandt et al., 1999).

Les mécanismes intervenant dans la survie des organismes symbiotiques mycorhiziens se développant sur des milieux contaminés par les ETM et la protection apportée par la colonisation symbiotique ont été répertoriés par Hildebrandt (2007), González-Guerrero et al. (2009) et Ferrol et al. (2009). Tout d'abord, un meilleur apport nutritif apporté par le CMA pourrait aider à la croissance des plantes parallèlement à une diminution de la concentration en métaux dans les parties aériennes (Heggo et al., 1990; Lee et George, 2005). D'autre part, dans les racines mycorhizées, il a été démontré que les métaux étaient préférentiellement accumulés dans les structures fongiques, préservant ainsi les tissus végétaux (Weiersbye et al., 1999; Rivera-Becerril et al., 2002). En effet, le Zn, le Cu et le Cd sont accumulés dans la paroi et dans des granules dans le cytoplasme des champignons alors que leur cytoplasme lui-même contient peu de métaux (González-Guerrero et al., 2008). De plus, les vacuoles et les

parois fongiques pourraient servir de compartiment de séquestration pour ces ETM (Turnau, 1998; Weiersbye et al., 1999; González-Guerrero et al., 2008).

Par ailleurs, Janoušková et al. (2006) ont démontré que les CMA étaient capables de réduire les effets indésirables du Cd sur la croissance des plantes par un processus de phytostabilisation. En effet, les plantes de tabac mycorhizées accumulent moins de Cd que celles non-mycorhizées et les hyphes de *Glomus intraradices* accumulent, quant à eux, 10 à 20 fois plus de Cd que les racines. La glomaline serait une fois de plus impliquée dans ce processus, puisqu'elle peut se lier aux ETM (González-Chávez et al., 2004). En accumulant et en rendant moins biodisponibles les métaux, les CMA protégeraient ainsi les plantes contre leurs effets néfastes.

Certains travaux suggèrent également que les CMA régulent certaines activités enzymatiques et l'expression de certains gènes chez la plante hôte probablement impliqués dans la tolérance aux ETM et /ou dans la détoxification (Repetto et al., 2003; Rivera-Becerril et al., 2005). En effet, l'expression des gènes *hgsh2* et *cht* codant respectivement pour une homoglutathion synthétase et une chitinase chez *Pisum sativum* L. colonisée par *Glomus intraradices* BEG141 est augmentée. En revanche, l'expression de *gr*, codant pour une glutathion réductase, ne varie pas chez les plantes de pois mycorhizées exposées ou non au cadmium tandis qu'elle augmente dans les plantes non mycorhizées développées en présence de l'ETM (Rivera-Becerril et al., 2005). De même, des gènes impliqués dans la tolérance aux ETM, tels que *LeMT2* (codant pour une métallothionéine), *LeNramp1* et *LeNramp3* (codant pour des transporteurs d'éléments métalliques) sont surexprimés chez les plantes non-mycorhizées tandis que leur expression ne varie pas chez les plantes mycorhizées, démontrant une plus haute tolérance aux ETM conférée aux plantes par la colonisation mycorhizienne.

Par ailleurs, il a été montré que certains gènes identifiés chez les CMA coderaient pour des protéines et des transporteurs impliqués dans cette meilleure tolérance des mycorhizes vis-à-vis des ETM. Par exemple, le gène *GintZnT1* code pour un transporteur de zinc dans les hyphes extra-racinaires de *Glomus intraradices* DAOM 197198 jouant un rôle dans le déplacement du zinc dans des compartiments intracellulaires ou en dehors des hyphes fongiques, ce qui indique son rôle dans l'atténuation du stress induit par le Zn (González-Guerrero et al., 2005). Ces résultats suggèrent que les CMA stockent le Zn en excès évitant ainsi son transport vers la plante et diminuant la quantité disponible dans les sols. De plus, les métallothionéines, protéines formées quand l'organisme est soumis au stress induit par les métaux lourds, sont capables de se lier à ces métaux. L'expression de gènes relatifs à ces protéines, tel que *GmarMT1*, dans les hyphes de *Gigaspora margarita* en présence de Cu et

de Zn pourrait servir à leur détoxification et à protéger les deux partenaires de la symbiose mycorhizienne (Lanfranco et al., 2002). La surexpression de gènes relatifs aux stress (protéine 'Heat shock', métallothionéine, glutathion-S-transférase) détectée chez les CMA pourrait également permettre la protection des deux partenaires de la symbiose mycorhizienne (Hildebrandt et al., 2007).

- Radioéléments

Les CMA peuvent également jouer un rôle protecteur chez les plantes se développant sur des sols contaminés par des radioéléments en réduisant l'absorption directe par l'hôte végétal, et ce, en réduisant l'accumulation du radiocésium dans les racines grâce à leur accumulation dans les structures extra-racinaires (Berreck et Haselwandter, 2001). Cependant, cette accumulation semble être limitée et il a été ainsi proposé que le CMA puisse restreindre l'acquisition de radiocésium par la plante en modifiant l'expression de gènes ou l'activité de transporteurs impliqués dans ce prélèvement par l'hôte végétal (Dupré de Boulois et al., 2005, 2006). Il a été cependant démontré que les CMA peuvent prélever et transporter le radiocésium aux racines (Declerck et al., 2003; Dupré de Boulois, 2005, 2006; Gyuricza et al., 2010). Ce transport semble tout de même être faible et la mobilisation du radioélément des racines jusqu'aux parties aériennes semble être également limitée par la colonisation, du fait d'un transport restreint le long du xylème (Gyuricza et al., 2010).

- Polluants organiques

Le rôle de la colonisation mycorhizienne et les mécanismes impliqués dans la tolérance des plantes aux polluants organiques sont beaucoup moins documentés que pour les autres stress abiotiques car ils ne font l'objet de recherches que depuis ces six dernières années.

Il a été montré que la croissance des racines mycorhizées étaient moins affectées, par la présence du chlorothalonil (un fongicide chloré isophtalonitrique) et du propiconazole (un fongicide IBS), quand celles-ci étaient colonisées par des CMA, suggérant un effet protecteur des CMA (Zhang et al., 2006; Calonne et al., 2012). D'autre part Campagnac et al. (2010) ont montré qu'alors les fongicides IBS (fenpropimorphe et fenhexamid) induisent un stress oxydant chez les racines de chicorée (surproduction d'un biomarqueur de peroxydation lipidique, le MDA et une chute de la quantité de l'acide gras C18:3), celui-ci étant atténué quand les racines sont colonisées par *Glomus intraradices* DAOM 197198. La tolérance induite face au stress oxydant résulterait de l'activité accrue d'enzymes anti-oxydantes chez

les plantes mycorhizées. En effet, l'activité de l'ascorbate-peroxydase (Zhang et al., 2006) et des peroxydases (Campagnac et al., 2010) augmentent chez les racines mycorhizées par comparaison aux racines non-mycorhizées. De plus, il a été montré que le gène *GintSOD1*, codant pour une CuZnSOD (superoxyde dismutase) chez *Glomus intraradices* DAOM 197198 serait impliqué dans la détoxification des ERO générées sous l'effet du fenpropimorphe (González-Guerrero et al., 2010).

A ce jour, la protection conférée aux plantes grâce à la colonisation mycorhizienne contre le stress induit par les HAPs est peu documentée. En 1998, Leyval et Binet ont montré que la mycorhization de l'ivraie par *Glomus mosseae* induit l'augmentation de la croissance racinaire et du taux de survie de la plante sur un sol contaminé par les HAPs. Puis, les travaux de Verdin et al. (2006) menés au sein de l'UCEIV ont également montré que l'anthracène a un effet négatif sur la croissance des racines de chicorée cultivée *in vitro* et que leur colonisation par *Glomus intraradices* DAOM 197198 conduit à une biomasse racinaire plus importante par rapport aux racines non-mycorhizées. Des études plus récentes ont démontré que les deux HAPs (l'anthracène et le B[a]P) induisent un stress oxydant chez les racines de chicorée cultivées *in vitro* et que le CMA *Glomus intraradices/irregulare* DAOM 197198 protège les plantes contre ce stress oxydant (Debiane et al., 2008, 2009, 2012). En effet, la production de MDA est significativement plus faible dans les racines mycorhizées, suggérant une atténuation de la peroxydation lipidique causée par les HAPs.

De plus, pour certaines concentrations d'HAPs, la mycorhization semble contribuer à la prévention de la formation de 8-OHdG, biomarqueur de génotoxicité induit en présence des HAPs. Cette protection apportée par la symbiose résulterait une fois de plus de l'augmentation des activités enzymatiques anti-oxydantes dans les racines mycorhizées, telle que l'activité superoxyde dismutase (Debiane et al., 2008, 2009).

*Cependant, malgré la protection conférée aux plantes par l'association mycorhizienne contre le stress induit par les polluants organiques, aucune étude n'a évalué l'impact des HAPs sur le transport d'un élément essentiel que constitue le P du CMA à la plante. Cet aspect sera ainsi traité dans le chapitre III de ma thèse et fera l'objet de l'article 2.*

# Le métabolisme lipidique des CMA

---

## I. Structure, composition et teneur des lipides des CMA

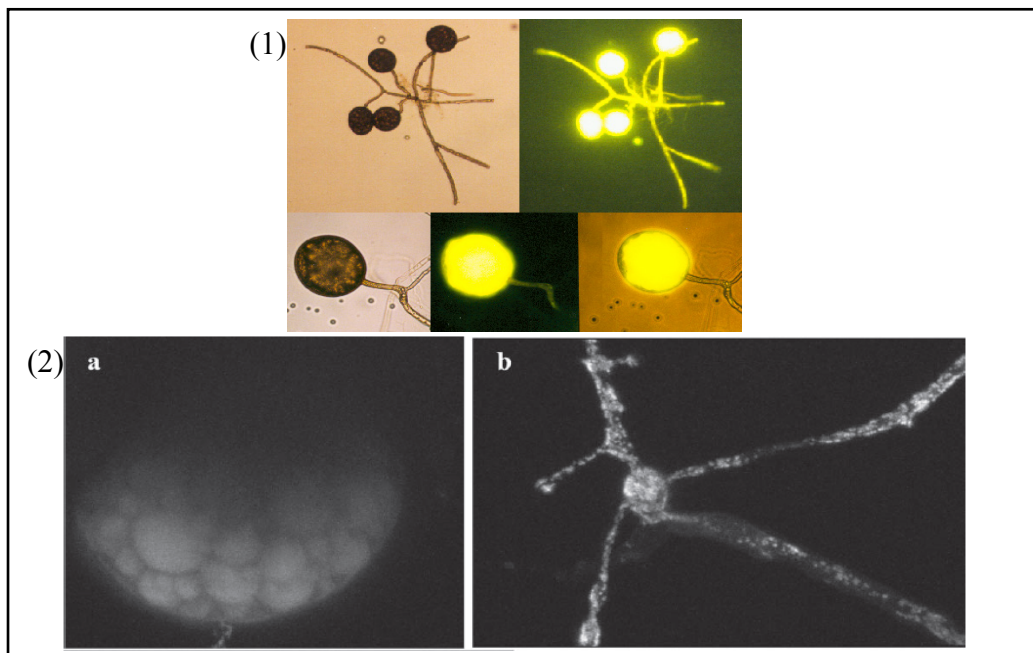
Le mycélium intra-racinaire et extra-racinaire des CMA est particulièrement riche en lipides ce qui permet d'ailleurs de les désigner comme des champignons « oléagineux » (Gaspar et al., 1994a). Les lipides de réserve (triacylglycérols ou TAG) sont particulièrement abondants et stockés dans les spores sous forme d'oléosomes ou globules lipidiques.

Les globules lipidiques sont des structures ubiquistes composées d'un cœur de lipides neutres (principalement des TAG et des esters de stérols) entouré par une monocouche de PL et des protéines associées (revues de Murphy et Vance, 1999; Murphy, 2012). Ils sont présents dans de nombreuses cellules et tissus. Les premières études leur ont attribué un rôle primaire dans le stockage des acides gras et des stérols (revue de Martin et Parton, 2005). Des études plus récentes indiquent que ces organites sont en réalité complexes et dynamiques et interagissant avec de nombreux composants cellulaires, dont les peroxysomes, les endosomes, le réticulum endoplasmique, les membranes et les mitochondries (revues de Murphy, 2001, 2012). D'après la revue de Murphy (2012), ces globules lipidiques sont présents chez tous les organismes allant des procaryotes jusqu'aux mammifères et leurs rôles dans les cellules sont nombreux comme par exemple le stockage de composés pouvant être toxiques pour l'organisme (acides gras libres non utilisés par l'organisme, composés lipophiles exogènes). Ils interviennent également dans la production des membranes et la reproduction sexuée/asexuée chez certains champignons, et peuvent être induits lors de la réponse et la lutte contre les stress induits par l'attaque de parasites, les maladies ou encore les stress abiotiques comme la déshydratation ou l'absence de source carbonée (procaryotes, champignons). Chez les mammifères, ils sont également impliqués dans l'homéostasie des lipides intracellulaires, comme le cholestérol, la réponse inflammatoire, la régulation thermique, la production de surfactants dans les cellules épithéliales pulmonaires, la sécrétion de lait... Chez les plantes, les globules lipidiques sont non seulement impliqués dans le développement des graines, des méristèmes, du tube pollinique mais aussi dans l'entrée en dormance des nodules racinaires. Les plastoglobules (nom spécifique des globules lipidiques dans les plastes) contiennent des enzymes spécifiques impliquées dans la lutte contre la sécheresse et les blessures ou dans la



protection des membranes des thylakoïdes et des protéines photosynthétiques contre les dommages causés par le stress oxydant (Porfirova et al., 2002; Kanwischer et al., 2005; Vidi et al., 2006; revue de Murphy, 2012)

Il est possible de visualiser au microscope les globules lipidiques des CMA après coloration au Fluorol yellow 088, un fluorochrome spécifique des lipides (Brundrett et al., 1991; Fontaine, 2001), au Soudan IV (Cooper et Lösel, 1978) ou au Rouge de Nile (Bago et al., 2002a) (Figure 16). Il a été montré que ces lipides circulent à l'intérieur des hyphes permettant les échanges carbonés entre le mycélium intra-racinaire et extra-racinaire des CMA (Bago et al., 2002a).



**Figure 16:** Observation au microscope des lipides de *Glomus intraradices* DAOM 197198 après (1) coloration au Fluorol Yellow 088 (d'après Fontaine, 2001) et (2) coloration des globules lipidiques d'une spore (a) et des hyphes germinatives (b) au rouge de Nile (d'après Bago et al., 2002a).

La composition et les teneurs lipidiques des CMA ont fait l'objet de quelques travaux depuis la fin des années 1970, montrant des variations dans la composition et la teneur lipidique en fonction de l'étape du cycle de développement du CMA ou en fonction de la structure étudiée (hyphes, spores, vésicules). En effet, peu ou pas de lipides sont détectés dans les arbuscules jeunes tandis qu'une plus forte quantité est observée dans les branches plus âgées des arbuscules ainsi que dans le mycélium intra-racinaire et dans les vésicules de *Glomus* (Cooper et Lösel, 1978).

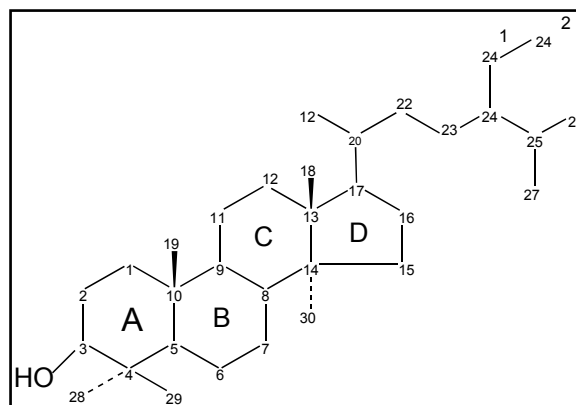
Les lipides des CMA sont communément dissociés en trois catégories: les stérols, les lipides neutres et les lipides polaires, la fraction des lipides neutres étant toujours

prédominante sur celle des phospholipides (PL) (Jabaji-Hare et al., 1984; Olsson et Wilhelmson, 2000) et des stérols.

Les CMA sont des biotrophes obligatoires qui nécessitent la présence d'une plante hôte pour accomplir leur cycle de vie. Pour cette raison, seules de faibles quantités de matériel fongique (spores et mycélium extra-racinaire) étaient alors disponibles pour réaliser des analyses et qui, de plus, pouvaient ne pas être exempts d'organismes contaminants. L'avènement des systèmes de cultures monoxéniques de plusieurs espèces de CMA a été un évènement décisif dans le développement des connaissances sur les lipides des CMA et leur métabolisme ces dernières années (Grandmougin-Ferjani et al., 2005).

### I.1. Les stérols

Les stérols sont des composés tétracycliques dérivant du noyau cyclopentano hydrophénanthrène ou stérane sur lequel sont fixés deux groupements méthyle en position C10 et C13, une chaîne de base de 8 à 10 atomes de carbones pouvant même être alkylée en C17 et un groupe hydroxyle en position C3 (Figure 17).



**Figure 17:** Schéma d'un stérol et numérotation du squelette des stéroïdes conformément aux règles de l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

Ils représentent une faible proportion des lipides chez les CMA. En effet, 1% des lipides totaux chez *Glomus versiforme* correspond à la fraction stérolique (Gaspar et al., 1994a) et environ 0,4% du poids sec de *Glomus caledonius* (Beilby et Kidby, 1980b). En revanche, dans les vésicules fongiques, les stérols ne constituent que 6% du poids sec de la vésicule (soit 11% des lipides totaux des vésicules) (Jabaji-Hare et al., 1984).

Des résultats contradictoires ont été publiés sur l'absence (Beilby et Kidby, 1980b; Nordby et al., 1981; Grandmougin-Ferjani et al., 1999) ou la présence d'ergostérol (Frey et

al., 1992, 1994; Fujiyoshi et al., 2000) chez les CMA. L'ergostérol est fréquemment le stérol majeur chez les champignons (Weete, 1989; Weete et Gandhi, 1996; Weete et al., 2010) bien que certains clades fongiques présentent d'autres composés majoritaires tels que le cholestérol, le brassicastérol et les 24-alkylstérols (Weete et al., 2010). Les travaux menés sur *Glomus intraradices* DAOM 197198 cultivé en conditions monoxéniques ont permis de confirmer l'absence de ce stérol dans le profil lipidique des CMA (Fontaine et al., 2001b, 2004, Olsson et al., 2003) ainsi que la biosynthèse de 24-alkylstérols et non d'ergostérol comme produits majeurs (Fontaine et al., 2001b). L'ergostérol détecté dans le mycélium extra-racinaire de CMA isolé à partir de plantes mycorhizées cultivées en pot ou encore dans les racines mycorhizées (Frey et al., 1992, 1994; Fujiyoshi et al., 2000) pourrait alors provenir d'organismes fongiques saprotrophes ou pathogènes (Grandmougin-Ferjani et al., 2005) présents dans les spores de CMA.

La composition stérolique des CMA est atypique. Parmi la classe des Glomeromycètes, divisée en 3 ordres: les *Diversisporales*, les *Gigasporales* et les *Glomerales* (Oehl et al., 2011), 16 espèces dans ces trois ordres ont montré des similitudes dans leur composition stérolique (Grandmougin-Ferjani et al., 1999). En effet, celle-ci présente un mélange de 24-alkylstérols dont les deux principaux stérols sont le 24-éthylcholestérol et le 24-méthylcholestérol (Figure 18). Ces derniers représentent entre 66% et près de 100% de la quantité totale en stérols chez différentes espèces de *Glomus* (ordre des *Glomerales*) (Nordby et al., 1981; Grandmougin-Ferjani et al., 1999; Declerck et al., 2000; Fontaine et al., 2001b, 2004), entre 80 et 99% des stérols totaux chez *Gigaspora margarita* (ordre des *Gigasporales*) (Grandmougin-Ferjani et al., 1999; Salvioli et al., 2010) et entre 89 et 94% des stérols totaux dans les spores des *Acaulospora* (ordre des *Diversisporales*) (Beilby, 1980; Grandmougin-Ferjani et al., 1999).

D'autres stérols minoritaires ont été identifiés chez ces trois différents ordres: le cholestérol, le  $\Delta^5$ -avenastérol et le 24-éthylcholesta-5,22-dienol (Beilby et Kidby, 1980b; Grandmougin et al., 1999; Declerck et al., 2000; Fontaine et al., 2001b). De plus, le desmostérol, 24-éthylidène cholestérol, 24-éthyl-25(27)-méthylène cholestérol ont été identifiés chez *Gigaspora margarita* (Salvioli et al., 2010).

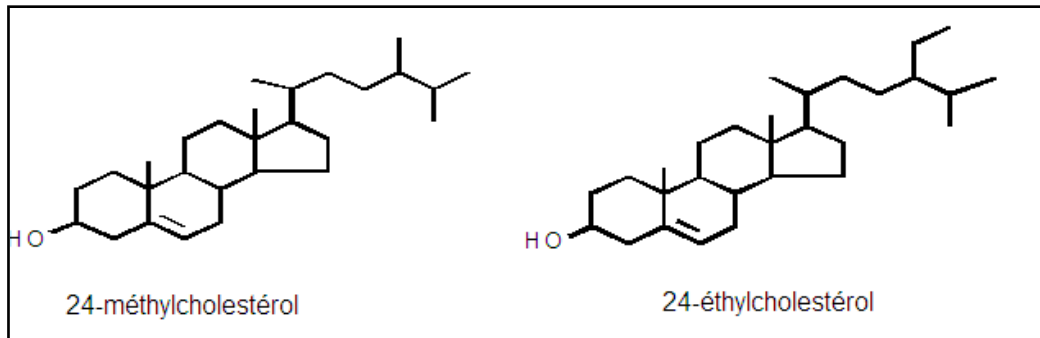


Figure 18: Structure des stérols majeurs chez les CMA.

Les stérols peuvent être présents sous forme libre ou sous une forme conjuguée, avec un acide gras par exemple pour former des esters de stérols correspondant à une forme de stockage des stérols dans les globules lipidiques intracellulaires (revues de Parks et Weete, 1991; Zweytick et al., 2000) ou encore avec un glucide pour former des glycosides de stérols (GS) (Figure 19). Ces GS peuvent à leur tour être estérifiés par un acide gras pour aboutir à des acyl-glycosides de stérols (AGS) (Figure 19). Les GS sont présents chez de nombreux organismes fongiques mais en quantité moindre (Sakaki et al., 2001; revue de Grille et al., 2010). En revanche les AGS sont présents chez les champignons de façon plus ponctuelle (revue de Grille et al., 2010).

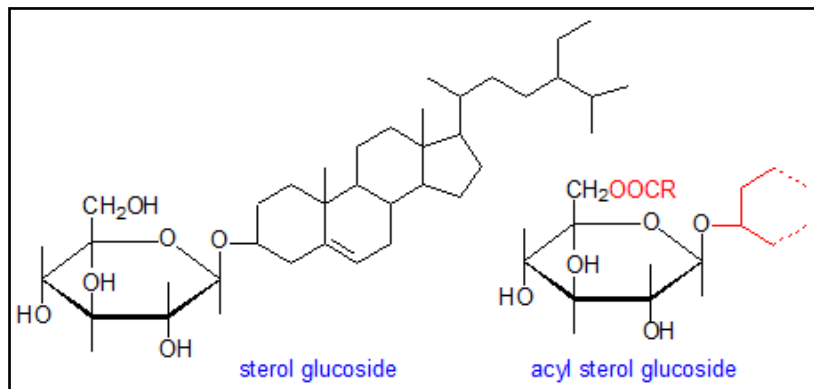


Figure 19: Structure des glycosides de stérols et acyl-glycosides de stérols (AGS) (Christie, <http://lipidlibrary.aocs.org/lipids.html>).

Dans les CMA, le mycélium extra-racinaire de *Glomus intraradices* DAOM 197198 cultivé *in vitro* comporte des stérols majoritairement sous forme libres suivis des esters de stérols, que le CMA soit relié ou non aux racines ainsi que dans les spores en germination (Fontaine et al., 2001b). Ce résultat est en accord avec ceux obtenus précédemment par Beilby et Kidby (1980b) durant les premiers jours de germination des spores de *Glomus caledonium*.

Selon le stade de développement des CMA, la quantité et les proportions des stérols peuvent varier :

- Lors du processus de germination: après 21 jours de germination, la quantité totale en stérols dans les spores de *Glomus caledonius* augmente progressivement de 0,39% de poids sec à 1,36%. (Beilby et Kidby, 1980b). Ces résultats vont dans le sens que ceux obtenus par Fontaine et al. (2001b) qui ont démontré une synthèse active des stérols libres lors du processus de germination nécessaires à l'élaboration des membranes des tubes germinatifs. La fraction des stérols libres est la forme majeure des stérols totaux. Elle est composée principalement par du 24-méthylcholestérol, que ce soit dans *Glomus caledonius* (Beilby et Kidby, 1980b) ou *Glomus intraradices* DAOM 197198 (Fontaine et al., 2001b). Les concentrations des stérols libres majoritaires augmentent au début de la germination puis diminuent fortement lorsque l'élongation des tubes germinatifs cesse, parallèlement à l'augmentation des esters de stérols, forme de stockage des stérols (Beilby et Kidby, 1980b).
- La composition en stérols (stérols libres et esters) de *Glomus intraradices* DAOM 197198 est stable dans des cultures âgées de 4 mois mais placées dans des conditions différentes : lorsque le mycélium extra-racinaire analysé est relié aux racines hôtes, lorsqu'il est privé de sa plante hôte pendant 3 jours ou que les spores isolées soient placées en conditions de germination pendant 3 jours (Fontaine et al., 2001b)
- En revanche, la composition et les quantités en stérols changent en fonction de l'ontogénie des spores de *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198. Lors de cette expérience, le mycélium est récolté après 3 à 4 semaines et comporte un réseau d'hyphes présentant de rares spores juvéniles translucides, puis récolté après 6 à 8 semaines : les hyphes portent de nombreuses spores jaunes en maturation et enfin récolté après 10 à 12 semaines quand la sporulation est bien établie et que les spores de couleur brune sont à maturité. Les analyses montrent clairement une diminution de la quantité de stérols durant l'ontogénie sporale ainsi que des changements dans les proportions des 24-alkylstérols : 24-méthylcholestérol et 24-éthylcholestérol (Campagnac, données non publiées).

L' $\alpha$ -amyrine, un trétratèrène pentacyclique, fréquemment rencontré chez les plantes vasculaires (Boar et Allen, 1973), a également été détecté dans les spores de nombreux CMA (Grandmougin-Ferjani et al., 1999). Cependant, des expériences de radiomarquage à l'acétate [ $1-^{14}\text{C}$ ] de sodium, en tant que précurseur des lipides, pour explorer la capacité de *Glomus*

*intraradices* DAOM 197198 à synthétiser ses propres stérols, ont montré que ce composé n'était pas radiomarké, quel que soit le stade de développement du CMA et proviendrait probablement du partenaire végétal (Fontaine et al., 2001b).

## I.2. Les acides gras

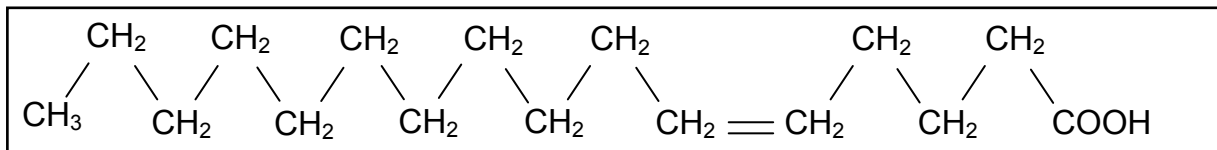
Les CMA possèdent une autre caractéristique biochimique qui les distinguent des autres champignons, qui consiste en la présence d'acides gras atypiques dans de nombreuses espèces de *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Entrophospora* et *Scutellospora* tels que les C16:1 $\omega$ 5, C18:1 $\omega$ 7, C18:1 $\omega$ 9 ainsi que des acides gras polyinsaturés (Tableau 2).

La taxonomie des CMA peut être réalisée à partir d'analyses biochimiques et notamment grâce aux analyses sur les acides gras. En effet, d'après Graham et al. (1995), les lipides des CMA pourrait permettre de préciser leur position taxonomique. Ainsi, plusieurs travaux ont été menés sur les profils d'acides gras afin de définir la position taxonomique des différentes espèces de CMA (Jabaji-Hare, 1988; Sancholle et Dalpé, 1993; Graham et al., 1995; Bentivenga et Morton, 1996; Declerck et al., 2000).

La composition en acides gras des CMA présente une large distribution allant de C12 à C26 chez certaines espèces (Tableau 2). Ils peuvent contenir des acides gras à longues chaînes polyinsaturés à 20 et 26 atomes de carbone comme chez les *Acaulosporaceae*, certaines espèces de *Glomus* et la plupart des *Gigasporaceae* et *Scutellosporaceae* (Tableau 2). Des acides gras à chaînes impaires sont parfois signalés de façon sporadique (Beilby et Kidby, 1980a; Jabaji-Hare, 1988; Sancholle et Dalpé, 1993, Bentivenga et Morton, 1994, 1996; Trépanier et al., 2005). La composition en acides gras semble rester stable après plusieurs générations de CMA cultivés en pots et elle n'est pas affectée par l'identité de la plante hôte mais elle peut être affectée dans les spores ayant subi une longue période de stockage (Bentivenga et Morton, 1994). Différents auteurs ont signalé des changements dans le profil des acides gras en lien avec l'âge des spores analysées (Jabaji-Hare, 1988) alors qu'Olsson et Johansen (2000) n'ont pas détecté de différences significatives dans la composition en acides gras d'un mycélium âgé de 1 et 3 mois. Des expériences conduites sur des cultures monoxéniques d'âges différents ont permis de confirmer une modulation de la composition en acides gras en fonction de l'ontogénie sporale en particulier un enrichissement net en C16:1 $\omega$ 5, acide gras fortement lié aux lipides de réserve dans les spores matures (Campagnac, données non publiées).

Les acides gras saturés majoritaires chez tous les CMA sont l'acide palmitique C16:0 (Tableau 2), représentant entre 5 et 42% des acides gras totaux, selon les espèces de CMA et l'acide stéarique C18:0, présent en plus faible proportion (Jabaji-Hare, 1988; Sancholle et Dalpé, 1993 ; Gaspar et al., 1994a,b ; Bentivenga et Morton 1994, 1996; Graham et al., 1995; Declerck et al., 2000).

Les acides gras monoinsaturés sont les acides majoritaires chez tous les CMA et représentent souvent plus de 50% des acides gras totaux (Graham et al., 1995). Parmi eux, l'acide gras palmitoléique C16:1 $\omega$ 5 (Figure 20), acide gras présent à hauteur de 16 à 89% dans les spores et les vésicules de différentes espèces de *Glomus* et l'acide oléique C18:1 $\omega$ 9, présent en proportions moindres de 1 à 16% (Jabaji-Hare, 1988; Gaspar et al., 1994b, Graham et al., 1995; Bentivenga et Morton, 1996; Declerck et al., 2000; Madan et al., 2002; Trépanier et al., 2005). Cependant, certaines espèces de *Glomus*, telles que *Glomus caledonium*, *Glomus intraradices* (DAOM 184739), *Glomus macrosporum*, *Glomus rubiforme* et *Glomus* sp. présentent des pourcentages de C16:1 inférieurs à 10% par rapport aux acides gras totaux et des pourcentage de C18:1 compris entre 10 et 25% (Sancholle et Dalpé, 1993).



**Figure 20:** Molécule de l'acide gras majoritaire chez les CMA, l'acide palmitoléique C16:1 $\omega$ 5.

Par ailleurs, la quantité du C16:1 $\omega$ 5, acide gras majoritaire chez les *Glomus* se situe entre 14 et 25% des acides gras associés aux PL (AGPL) totaux, comme montré chez *Glomus* WUM10 et *Glomus caledonium* et entre 55 et 80% des acides gras neutres totaux de ces trois espèces (Olsson et al., 1995, revue de Olsson, 1999). Proportionnellement, cet acide gras est retrouvé à hauteur de 2% dans les PL et donc de 98% dans les lipides neutres (revue de Olsson, 1999), les principaux lipides de stockage.

Tandis que l'acide gras saturé majoritaire chez tous le genres de CMA est le C16:0, l'acide gras monoinsaturé majeur varie selon les genres. En effet, tandis que le C16:1 $\omega$ 5 est l'acide gras monoinsaturé majeur chez les *Acaulospora*, *Entrophospora* et les *Glomus*, les *Gigaspora* possèdent comme acides gras monoinsaturé prédominant le C18:1 $\omega$ 9 (notamment dans les spores et les vésicules) tandis que le C16:1 $\omega$ 5 est pas ou peu représenté (Jabaji-Hare, 1988; Bentivenga et Morton, 1994, 1996; Graham et al., 1995; Madan et al., 2002; Trépanier

et al., 2005; Salvioli et al., 2010). En revanche, les résultats obtenus des travaux menés sur les *Scutellospora* montrent des divergences concernant l'acide gras monoinsaturé majeur, semblant être lié aux espèces étudiées. En effet, le C16:1 $\omega$ 5 est majoritaire chez *Scutellospora calospora*, *dipurpurascens*, *erythropha*, *fulgida*, *heterogama* et *pellucida* et « species » (Sancholle et Dalpé, 1993; Graham et al., 1995; Bentivenga et Morton, 1996; Madan et al., 2002) tandis que le C18:1 $\omega$ 9 est majoritaire chez *Scutellorospira persica* et *verrucosa* (Graham et al., 1995; Bentivenga et Morton, 1996).



Synthèse bibliographique  
Partie 3: Le métabolisme lipidique des CMA

Espèces étudiées	organes	Longueurs des chaînes acyles	Acide gras saturé majeur	Acide gras monoinsaturé majeur	Acides gras à longue chaîne polyinsaturés	Acides gras à chaînes impaires	Références
<i>Acaulospora laevigatum</i>	spores	Non précisé	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	20 :4	Non signalé	Graham et al., 1995
<i>Acaulospora laevis</i>	spores	C14 à C26	16 :0	16 :1 $\omega$ 7 (?)	20 :2 à 26 :3	23 :3 et 25 :3	Beilby et Kidby, 1980a
	spores						
<i>Acaulospora longula</i>	spores	Non précisé	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	20 :4	Non signalé	Graham et al., 1995
<i>Acaulospora mellea</i>	spores	Non précisé	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	20 :4	Non signalé	Graham et al., 1995
<i>Acaulospora morrowiae</i>	spores	Non précisé	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	20 :4	Non signalé	Graham et al., 1995
<i>Acaulospora nicolsonii</i>	spores	C 14 à C22	16 :0	16 :1 trans et 18 :1 trans	20 :5	Non signalé	Sancholle et Dalpé, 1993
<i>Acaulospora spinosa</i>	spores	Non précisé	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	20 :4	Non signalé	Graham et al., 1995
<i>Entrophospora colombiana</i>	spores	Non précisé	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	Non	Non signalé	Graham et al., 1995
<i>Entrophospora contigua</i>	spores	Non précisé	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	20 :4	Non signalé	Graham et al., 1995
<i>Glomus antarcticum</i>	spores	C 14 à C22	16 :0	16 :1	20 :3 à 22 :4	Non signalé	Gaspar et al., 1994b
<i>Glomus caledonius</i>	spores	C14 à C26	16 :0	16 :1 $\omega$ 7 (?)	20 :2 à 26 :3	23 :3 et 25 :3	Beilby et Kidby, 1980a
<i>Glomus caledonium</i>	spores	C14 à C22	18 :0 et 16 :0	18 :1 cis	20 :4 et 20 :5	Non signalé	Sancholle et Dalpé, 1993
<i>Glomus coronatum</i>	spores	C16 à C24	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	20 :2 à 20 :5	Non signalé	Madan et al., 2002
<i>Glomus claroideum</i>	spores	C16 à C20	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	Non signalé	19	Bentivenga et Morton, 1994
	spores	Non précisé	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	Non	Non signalé	Graham et al., 1995
<i>Glomus clarum</i>	spores	C14 à C22	16 :0	16 :1	20 :3 à 22 :4	Non signalé	Gaspar et al., 1994b
	spores	Non précisé	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	20 :4	Non signalé	Graham et al., 1995
<i>Glomus diaphanum</i>	spores	Non précisé	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	Non	Non signalé	Graham et al., 1995
<i>Glomus etunicatum</i>	spores	C16 à C20	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	Non	19	Bentivenga et Morton, 1994
	spores	Non précisé	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	Non	Non signalé	Graham et al., 1995
<i>Glomus fasciculatum</i>	spores	C14 à C22	16 :0	16 :1	20 :3 à 22 :4	Non signalé	Gaspar et al., 1994b
<i>Glomus intraradices</i>	spores	C 14 à C24	16 :0	16 :1	20 :3 et 22 :6	19 :0 et 25 :0	Jabaji Hare, 1988
	spores	Non précisé	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	20 :4 sur certains isolats	Non signalé	Graham et al., 1995
	spores	C14 à C20	16 :0	16 :1 trans et cis 18 :1 cis	20 :5	Non signalé	Sancholle et Dalpé, 1993
	jeunes spores	C14 à C18	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	Non	Non signalé	Grandmougin-Ferjani et al., 1997
	spores	C14 à C18	16 :0	18 :1 et 16 :1 $\omega$ 5	Non	Non signalé	Grandmougin-Ferjani et al.,

*Synthèse bibliographique*  
*Partie 3: Le métabolisme lipidique des CMA*

	matures spores « <i>in vitro</i> »	C14 à C22	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	20:3, 20:4 et 20:5	Non signalé	Fontaine, 2001
	spores « <i>in vitro</i> »	C12 à C24	16:0	16 :1 $\omega$ 5	20:2 à 20:5	15 et 15:1	Trépanier et al., 2005
<i>Glomus leptotichum</i>	spores	Non précisé	16 :0	18 :1 $\omega$ 9	Non	Non signalé	Graham et al., 1995
	spores	C16 à C20	16 :0	18 :1 $\omega$ 9	20 :4	19	Bentivenga et Morton, 1996
<i>Glomus macrocarpum</i>	spores	C14 à C22	16 :0	18 :1 cis	Non	Non signalé	Sancholle et Dalpé 1993
<i>Glomus mosseae</i>	spores	C 14 à C18	16 :0	16 :1	20 :3 à 22 :4	Non signalé	Gaspar et al., 1994
	spores	C16 à C24	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	20 :3 à 20 :5	Non signalé	Madan et al., 2002
	spores	C14 à C20	16 :0	16 :1 cis	20 :5	17 :0 traces	Sancholle et Dalpé, 1993
<i>Glomus occultum</i>	spores	Non précisé	16 :0	16 :1 $\omega$ 7	Non	Non signalé	Graham et al., 1995
<i>Glomus proliferum</i>	Spores « <i>in vitro</i> »	C16 à C18	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	Non détectés (donnée non publié)	Non détectés (donnée non publié)	Declerck et al. 2000
<i>Glomus versiforme</i>	spores	C 14 à C18	16 :0	16 :1	20 :3 à 22 :4	Non signalé	Gaspar et al., 1994a
	vésicules	C14 à C20	16 :0	16 :1	20 :3	19 :0	Jabaji Hare, 1988
<i>Glomus vesiculiferum</i>	vésicules	C14 à C20	16 :0	16 :1	20 :3	19 :0	Jabaji Hare, 1988
<i>Gigaspora albida</i>	spores	Non précisé	16 :0	18:1 $\omega$ 9	20 :4	Non signalé	Graham et al., 1995
	spores	C16 à C 20	16 :0	18:1 $\omega$ 9	20 :4	19	Bentivenga et Morton, 1996
<i>Gigaspora decipiens</i>	spores	C16 à C 20	16 :0	18:1 $\omega$ 9	20 :4	19	Bentivenga et Morton, 1996
<i>Gigaspora gigantea</i>	spores	Non précisé	16 :0	18:1 $\omega$ 9	20 :4 sur certains isolats	Non signalé	Graham et al., 1995
	spores	C16 à C20	16 :0	18:1 $\omega$ 9	20 :4	19	Bentivenga et Morton, 1996
<i>Gigaspora rosea</i>	Spores	C16 à C18	16 :0	18:1 $\omega$ 9	20 :4	Non signalé	Bentivenga et Morton, 1994
	spores	C16 à C20	16 :0	18:1 $\omega$ 9	20 :4	19	Bentivenga et Morton, 1996
	Spores « <i>in vitro</i> »	C14 à C24	16:0	18:1 $\omega$ 9	20:2 à 20:5	15	Trépanier et al., 2005
<i>Gigaspora heterogama</i>	spores	C16 à C18	16 :0	16 :1 $\omega$ 5	Non signalé	19	Bentivenga et Morton, 1994

**Tableau 2:** Composition en acides gras totaux des CMA isolés à partir de cultures en pots ou monoxéniques.

*Synthèse bibliographique*  
*Partie 3: Le métabolisme lipidique des CMA*

<i>Gigaspora margarita</i>	spores	C 14 à C20	16 :0	18 :1	20 :3 et 20 :4	19 :0 et 25 :0	Jabaji Hare, 1988
	spores	C16 à C24	16 :0	18 :1 ω9	20 :2 à 20 :5	Non signalé	Madan et al., 2002
	spores	Non précisé	16 :0	18 :1 ω9	20 :4	Non signalé	Graham et al., 1995
	cellules auxiliaires	C 14 à C20	16 :0	18 :1	Non signalé	19	Jabaji Hare, 1988
	spores « <i>in vitro</i> »	C 12 à C22	16 :0	18 :1 ω9	20 :3 et 20 :4	Non signalé	Salvioli et al., 2010
<i>Scutellospora calospora</i>	spores	C16 à C24	16 :0	16 :1ω5	20 :5	Non signalé	Madan et al., 2002
		C16 à C20	16 :0	16 :1ω5	20 :4	19	Bentivenga et Morton, 1996
<i>Scutellospora dipurpurascens</i>	spores	Non précisé	16 :0	16 :1ω5	20 :4	Non signalé	Graham et al., 1995
		C16 à C20	16 :0	16 :1ω5	20 :4	19	Bentivenga et Morton, 1996
<i>Scutellospora erythropha</i>	spores	C14 à C20	16 :0	16 :1ω5	20 :4	19	Bentivenga et Morton, 1996
<i>Scutellospora fulgida</i>	spores	Non précisé	16 :0	16 :1ω5	20 :4	Non signalé	Graham et al., 1995
		C16 à C20	16 :0	16 :1 cis et 18 :1 cis	20 :5	Non signalé	Sancholle et Dalpé, 1993
	spores	C14 à C20	16 :0	16 :1ω5 et 18 :1	20 :4	19	Bentivenga et Morton, 1996
<i>Scutellospora heterogama</i>	spores	Non précisé	16 :0	16 :1ω5	Pas de 20 :4	Non signalé	Graham et al., 1995
		C14 à C20	16 :0	16 :1ω5	20 :4	19	Bentivenga et Morton, 1996
<i>Scutellospora pellucida</i>	spores	Non précisé	16 :0	16 :1ω5	20 :4	Non signalé	Graham et al., 1995
		C16 à C20	16 :0	16 :1ω5	20 :4	19	Bentivenga et Morton, 1996
<i>Scutellospora persica</i>	spores	Non précisé	16 :0	18 :1ω9	Pas de 20 :4	Non signalé	Graham et al., 1995
		C16 à C20	16 :0	18 :1ω9	20 :4	Non signalé	Bentivenga et Morton, 1996
<i>Scutellospora species</i>	spores	C16 à C20	16 :0	16 :1ω5	20 :4	19	Bentivenga et Morton, 1996
<i>Scutellospora verrucosa</i>	spores	Non précisé	16 :0	18 :1ω9	20 :4	Non signalé	Graham et al., 1995
		C16 à C20	16 :0	18 :1ω9	20 :4	19	Bentivenga et Morton, 1996

**Tableau 2 (suite):** Composition en acides gras totaux des CMA isolés à partir de cultures en pots et monoxéniques.

Les acides gras ne demeurent pas libres dans les cellules. En effet, la majorité d'entre eux sont estérifiés, en position *sn-1* et en position *sn-2* sur le groupement glycérol pour former les lipides membranaires, les PL, ou sur les trois positions du glycérol, formant ainsi les TAG, qui constituent la forme majeure de stockage de lipides (revue de Ohlogge et Browse, 1995).

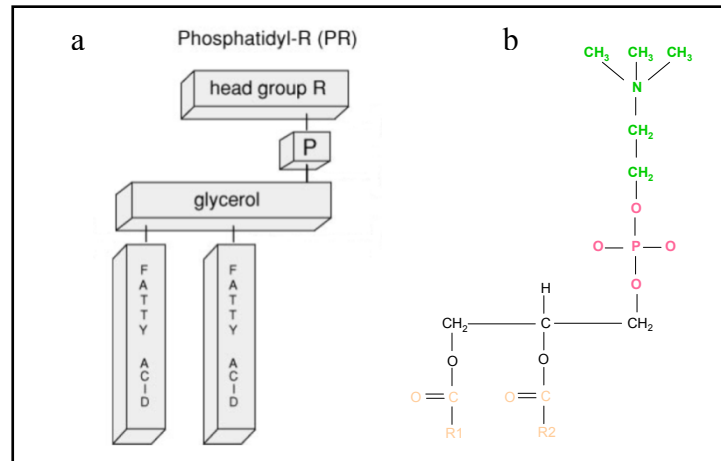
Les proportions entre lipides polaires et lipides neutres indiquent une très forte majorité de lipides neutres chez les CMA. En effet, 5% des acides gras totaux sont estérifiés aux phospholipides tandis que 95% le sont aux lipides neutres, en l'occurrence les triacylglycérols (Olsson, 1999).

D'autre part, selon qu'il soit estérifié à un PL ou à un TAG, les proportions de chaque acide gras peuvent varier. En effet, le C16:1 $\omega$ 5 est principalement estérifié aux TAG des vésicules fongiques tandis que le C18:2 sont les acides gras majoritairement estérifiés aux PL de ces vésicules (Jabaji-Hare et al., 1984).

### I.3. Les phospholipides (PL)

Les glycérophospholipides dérivent tous d'un précurseur commun, l'acide phosphatidique (AP) (ou diacylglycérophosphate), auquel est attaché une tête polaire de composition variable (Figure 21) (Leray, 2010). En plus de la stéréochimie du noyau glycérophosphate, les PL sont caractérisés par une asymétrie concernant la position des acides gras sur la molécule de glycérol. Généralement, les acides gras saturés sont positionnés sur le carbone *sn-1* tandis que les acides gras insaturés sont préférentiellement positionnés sur le carbone *sn-2* (Leray, 2010).

Trois principaux types de têtes polaires existent chez les phospholipides: la choline, l'éthanolamine et la sérine. D'autres têtes polaires peuvent être formées d'un ou deux phosphate et de deux glycérols pour former les phosphatidylglycérols (PG) ou encore avec un groupe phosphate et un inositol pour former les phosphatidylinositols (PI) (Leray, 2010).



**Figure 21:** (a) Schéma simplifié de la structure des phospholipides (d'après Ohlrogge et Browse, 1995). Head group = tête polaire; P = groupement phosphate; fatty acid = acide gras (b) Structure de la phosphatidylcholine. R1 et R2 correspondent à des chaînes d'acides gras saturés ou insaturés.

Selon les espèces de CMA, les PL représentent entre 2 à 23% des lipides totaux (Cooper et Lösel, 1978; Jabaji-Hare et al., 1984; Jabaji-Hare, 1988; Gaspar et al., 1994a; Fontaine et al., 2001a). Cette proportion semble plus élevée dans les hyphes extra-racinaires. En effet, le pourcentage de PL par rapport au total PL+TAG atteint 25% chez *Glomus intraradices* BEG87 (Olsson et Johansen, 2000). En revanche, cette proportion semble beaucoup plus faible dans les spores, composée majoritairement de TAG. En effet, le pourcentage des PL dans les spores non germées de *Glomus versiforme* atteint 9,7% par rapport aux lipides totaux alors que le pourcentage de PL dans les spores de *Glomus intraradices* BEG87 par rapport au total PL+TAG chute à moins de 1%.

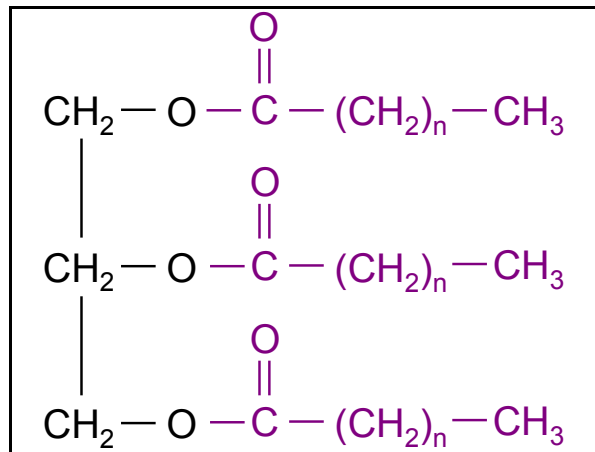
Le contenu phospholipidique semble également varier selon le stade de développement du CMA et selon les espèces. En effet, les travaux de Beilby et Kidby (1980a) démontrent que les spores non germées de *Glomus caledonium* contiennent majoritairement de la PC suivi de la phosphatidylsérine (PS) et de la phosphatidyléthanolamine (PE). Cependant, Cooper et Lösel (1978) ainsi que Gaspar et al. (1994a) rapportent que la PE est le PL majoritaire dans les spores non germées de *Glomus mosseae* et *Glomus versiforme*. Plus récemment, nos travaux au sein de l'UCEIV ont montré que le mycélium extra-racinaire (composé majoritairement de spores non germées) de *Glomus irregulare* DAOM 197198 cultivé *in vitro* contient principalement de la PC (Calonne et al., 2010; Debiane et al., 2011). Toutefois, d'après Beilby et Kidby (1980a), la PE semble devenir majoritaire dans les spores après germination.

Les acides gras majoritaires associés aux PL (AGPL) sont composés de 16 ou 18 atomes de carbones. En effet, les acides gras à 18 atomes de carbone semblent être

majoritaires dans les travaux de Johansen et al. (1996) (33 et 28% des AGPL totaux pour le C18:1 $\omega$ 7 et le C16:0 respectivement) et dans les travaux de Fontaine et al. (2001a). Des travaux plus récents au sein de l'UCEIV ont montré que l'acide gras C16:0 est prédominant dans les AGPL totaux (54 et 55% des AGPL totaux) devant les acides gras à 18 atomes de carbone (représentant ensemble 29% des AGPL totaux) dans le mycélium extra-racinaire de *Glomus irregulare* DAOM 197198 (Calonne et al., 2010; Debiane et al., 2011). Ces divergences obtenues au niveau des AGPL majoritaires pourraient s'expliquer par l'emploi de différentes techniques d'extraction des PL et des AGPL. En revanche, l'ensemble des travaux attestent que l'acide gras C16:1 $\omega$ 5 n'est pas un composé majoritaire dans les AGPL des CMA.

#### I.4. Les triacylglycérols (TAG)

Les TAG sont constitués par un glycérol estérifié par 3 acides gras (Figure 22).



**Figure 22:** Structure des triacylglycérols. En noir: le groupement glycérol, en violet: les chaînes acyles.

Les CMA sont très riches en lipides neutres, principalement sous forme de TAG, retrouvés de manière prépondérante dans les vésicules et les spores et constituant les principaux produits de stockage (Cooper et Lösel, 1978; Lösel et Cooper, 1979; Jabaji-Hare et al., 1984; Jabaji-Hare, 1988, Gaspar et al., 1994a), alors qu'ils semblent être rares dans les arbuscules (Nemec, 1981). Puisque la plupart des cellules utilisent les TAG comme réserve d'énergie, leur forte concentration dans les spores non germées indique que cette accumulation sert à produire des matériaux riches en énergie nécessaire à la germination.

Le mycélium de *Glomus intraradices* DAOM 197198 contient 57% de TAG (Fontaine et al., 2001a). Plus spécifiquement, les spores sont les structures les plus riches en TAG. En

effet, le pourcentage de lipides neutres atteint 99% dans les spores de *Glomus intraradices* par rapport au total PL+TAG (Olsson et Johanssen, 2000). De plus, la proportion des lipides neutres, composée principalement par les TAG atteint entre 80 et 95% des lipides totaux dans les spores non germées de différentes espèces de *Glomus* (Beilby et Kidby, 1980a; Jabaji-Hare, 1988; Gaspar et al., 1994a,b).

Dans les hyphes du mycélium extra-racinaire, la quantité de TAG est sensiblement plus faible. En effet, le pourcentage de lipides neutres atteint 75% par rapport au total PL+TAG (Olsson et Johanssen, 2000).

L'acide gras majoritairement estérifié aux TAG est le C16:1 $\omega$ 5 à hauteur de 49 à 89% selon les espèces de *Glomus*. Les deux acides gras majoritaires, le C16:0 et le C18:1 sont présents avec des proportions beaucoup plus faibles (Jabaji-Hare, 1988; Johansen et al., 1996; Olsson et Johansen, 2000).

## **II. Métabolisme lipidique chez les CMA**

Nos connaissances sur le métabolisme stérolique dans le mycélium extra-racinaire des CMA ont réellement progressé, depuis à peine plus de 10 ans, cela ayant été rendu possible grâce au développement des cultures *in vitro*. En effet, non seulement le champignon extra-racinaire peut être produit en quantité suffisante sans organismes contaminants pour réaliser des analyses mais il est possible de le cultiver séparément des racines. Dans ce système de culture, on peut apporter facilement des substrats radiomarqués ou des inhibiteurs pour étudier le métabolisme des lipides du champignon extra-racinaire ou des racines mycorhizées.

### II.1. Métabolisme stérolique chez les CMA

Grâce à des expériences de radiomarquage utilisant l'acétate [1-<sup>14</sup>C] introduit lors de différentes étapes du développement du CMA (en phase symbiotique, asymbiotique ou dans les spores en germination) cultivé en boîtes de Pétri bi-compartmentées, Fontaine et al. (2001a,b) ont démontré que, bien que les CMA soient hétérotrophes, ils sont capables de synthétiser *de novo* leurs propres stérols et ne les prélèvent pas sur leur plante-hôte comme on aurait pu le supposer chez ces biotrophes obligatoires. L'incorporation de l'acétate [1-<sup>14</sup>C] a permis le marquage des stérols de fin de chaîne (24-méthylcholestérol, 24-éthylcholestérol,

24-éthylcholesta-5,22-dienol) et de précurseurs (lanostérol, 24-méthylène lanostérol, épistérol, 24-méthylènecholestérol, 24-méthylidémolestérol,  $\Delta^5$ -avénostérol) (Fontaine et al., 2001b).

D'autre part, grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase, la mévinoline, Fontaine et al. (2001b) ont démontré que l'acétate est métabolisé en stérols par la voie classique du mévalonate, comme pour le champignon filamenteux *Aschersonia aleyrodis* et la levure *Rhodotorula glutinis* (Disch et Rohmer, 1998). Ainsi, une voie hypothétique de biosynthèse des stérols chez les CMA a pu être établie (Figure 23) (Grandmougin-Ferjani et al., 2005). Cette voie démarre par la polymérisation du groupement acétyle de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) qui est transformé en acide mévalonique puis en isoprène et enfin en squalène. Celui-ci est cyclisé en lanostérol (premier produit cyclique) avant de donner une suite d'autres produits cycliques jusqu'aux stérols majeurs de fin de chaîne qui s'accumulent: le 24-méthylcholestérol et le 24-éthylcholestérol. Dans les spores en germination, la dégradation des lipides de réserves grâce aux enzymes lipolytiques (Gaspar et al., 1994a) serait essentiellement orientée vers la production des membranes et par conséquent en partie vers les stérols (Fontaine et al., 2001a). Les études sur *Glomus intraradices* DAOM 197198 ont montré que les stérols sont synthétisés dans toutes les structures étudiées (mycélium extra-racinaire, spores en germination) et n'ont pas comme les acides gras, un lieu de synthèse privilégié, le mycélium intra-racinaire, impliquant un transport ultérieur pour leur métabolisation vers le mycélium extra-racinaire. Campagnac et al. (2009) ont démontré qu'aucun transport de molécules stéroliques marquées par le  $^{14}\text{C}$  n'avait lieu entre les hyphes extra-racinaires et intra-racinaires.

Enfin, à ce jour, un seul gène dans la voie de biosynthèse des stérols chez les CMA a été caractérisé, *GintSMO*, codant pour l'enzyme C-4 sterol methyl oxydase et dont l'expression change dans les hyphes extra-racinaires de *Glomus intraradices* DAOM 197198 cultivé *in vitro* exposé à un fongicide inhibiteur de la biosynthèse des stérols, le fenpropimorphe (Oger et al., 2009).



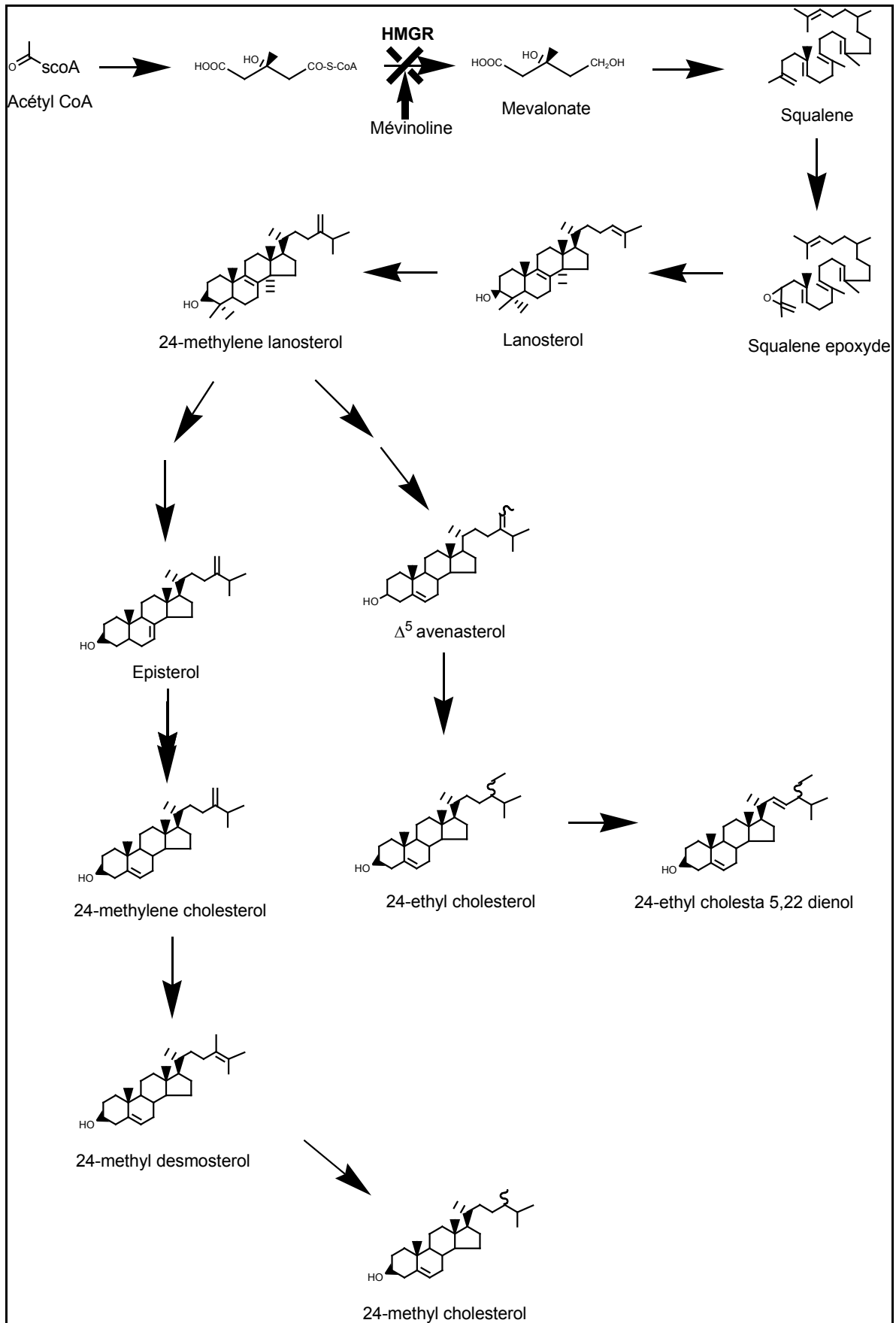


Figure 23: Biosynthèse des stérols chez *Glomus intraradices* DAOM 197198 (d'après Grandmougin-Ferjani et al., 2005).

## II.2. Métabolisme des acides gras, PL et TAG

Les techniques de pointes comme la RMN (spectrométrie à résonance magnétique nucléaire) ont permis de mettre en évidence le transfert de carbone de la plante vers le champignon et leur utilisation dans la biosynthèse des lipides. Cependant, suivant les structures fongiques (spores en germination, mycélium intra- ou extra-racinaire), le métabolisme des lipides fongiques peut varier.

### II.2.1. Spores en germination

La quantité des lipides dans les spores non germées de *Acaulospora laevis* et *Glomus caledonius* représente plus de 50% de leur poids sec (Beilby et Kidby, 1980a; Beilby, 1983; Schubert et al., 1992) jusqu'à atteindre 70% du poids de la spore après germination (Beilby et Kidby, 1980a). Ces réserves de carbone et d'énergie sont suffisamment abondantes pour supporter la germination de la spore et la croissance des hyphes germinatives (Bago et al., 2000; Trépanier et al., 2005). Les travaux de Beilby (1980) et Beilby et Kidby (1980a) puis de Fontaine et al. (2001a) ont montré l'incorporation d'acétate  $^{14}\text{C}$  d'abord dans les TAG [(dont la quantité reste constante durant approximativement 5 jours après germination (Bécard et al., 1991; Gaspar et al., 1994a)] et les acides gras libres dans les spores avant germination. La synthèse *de novo* des lipides a lieu simultanément avec l'hydrolyse des lipides (Beilby, 1983). En effet, par la suite, la quantité des TAG chute continuellement de près de 4 fois dans les spores tandis que les PL et les acides gras à longues chaînes voient leurs quantités tripler (Gaspar et al., 1994a). Puisque ces derniers sont considérés comme des molécules structurales avec d'importantes fonctions comme composants membranaires, leur augmentation peut être liée aux besoins de nouveaux matériaux pour former les tubes germinatifs émergents de la paroi de la spore et peut être corrélée à la longueur des hyphes produites par les spores (Gaspar et al., 1994a). Il a donc été suggéré que la dégradation des TAG pouvait procurer le squelette carboné ainsi qu'une source énergétique pour la synthèse des autres lipides comme les PL (Beilby et Kidby, 1980a; Gaspar et al., 1994b; Bago et al., 1999) ou les stéroïdes (Fontaine et al., 2001b). Leur dégradation impliquerait donc l'action d'enzymes hydrolytiques du type lipase (triacylglycéról hydrolase, EC 3.1.1.3) qui catalysent la rupture des TAG en glycéról et en acides gras libres (Beilby et Kidby, 1980b; Bécard et al., 1991; Derewenda, 1994; Gaspar et al., 1994a, 1997). D'ailleurs, il a été proposé que la chute des acides gras

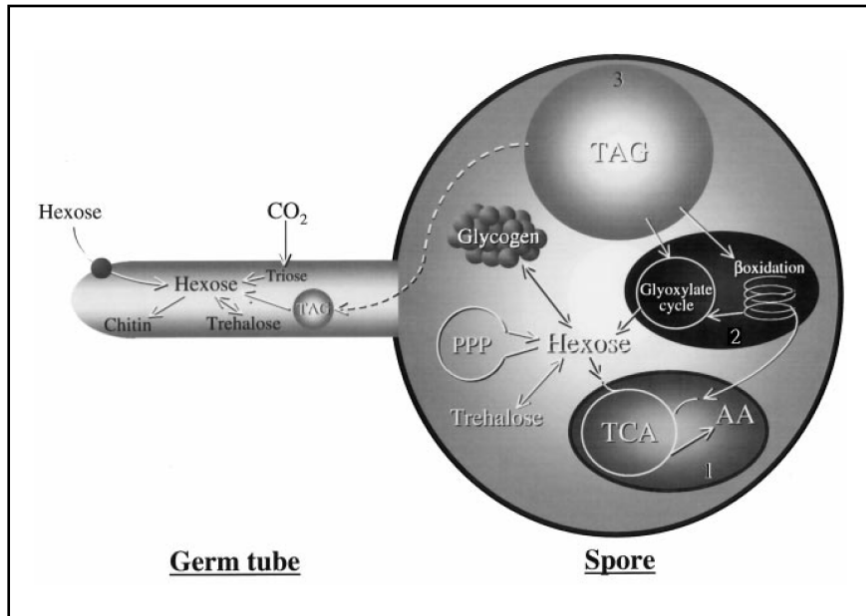
majoritaires associés aux TAG (C16:1 et C16:0) puisse être utilisée, en partie, pour l'apport d'énergie durant la germination de la spore (Gaspar et al., 1994a). Ces acides gras libres à 16 atomes de carbone pré-existants dans les spores en germination peuvent être allongés ou désaturés sous l'action d'élongases et de désaturases, tandis que les spores seraient incapables de synthétiser *de novo* des acides gras à 16 atomes de carbone (C16:0 ou C16:1) chez *Glomus intraradices* DAOM 197198 et *Gigaspora rosea* (Trépanier et al., 2005). Ces auteurs suggèrent que l'acide gras synthétase ne soit pas exprimée dans les spores mais que celle-ci le soit exclusivement dans le mycélium intra-racinaire. Contrairement aux acides gras, la synthèse *de novo* de stérols, sous leur forme libre a lieu de façon active dans les spores en germination ainsi que celle des PL (Fontaine et al., 2001a) alors que la synthèse de la forme stérolique de réserve, les esters de stérols est très réduite (Fontaine et al., 2001b) montrant ainsi le besoin accru de lipides membranaires durant l'élongation des tubes germinatifs.

D'autre part, la synthèse de la paroi cellulaire et de l'ADN nécessite des besoins accrus en éléments carbonés. Comme la majorité de ces éléments carbonés est sous la forme de lipides, l'une des hypothèses émises serait également que la conversion des lipides en hexose *via* le cycle du glyoxylate est importante à ce stade du cycle de développement des CMA (Figure 24) (Bago et al., 1999).

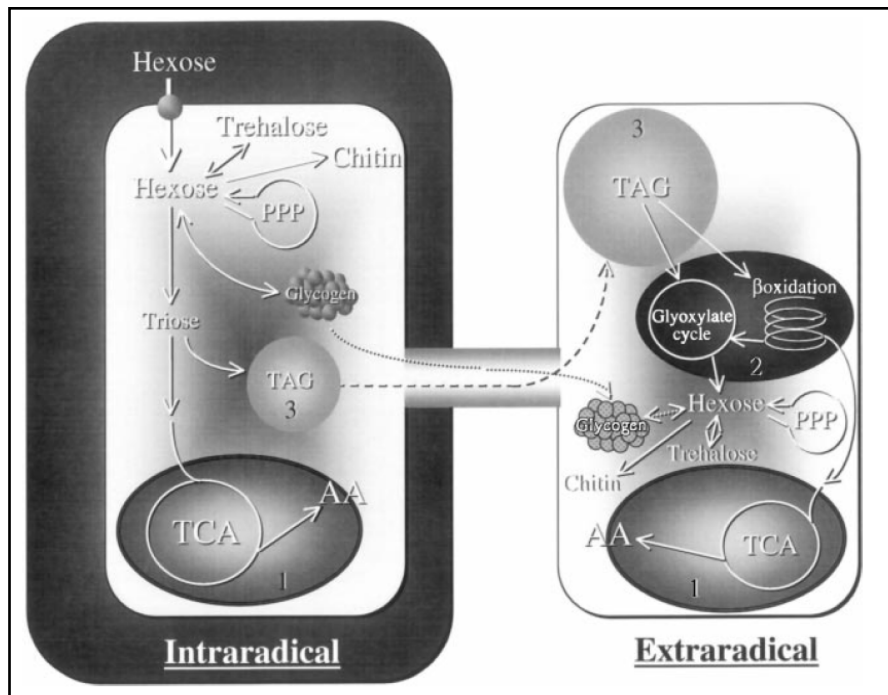
### II.2.2. Mycélium intra-racinaire

Etant hétérotrophe pour le carbone, les CMA obtiennent leurs éléments carbonés de la plante hôte. En effet, l'exposition de la plante au  $^{14}\text{CO}_2$  marqué a permis de démontrer le transfert de photosynthétats marqués vers les spores et les hyphes extra-racinaires des CMA (Ho et Trappe, 1973; Bevedge et al., 1975) et dans les hyphes, vésicules et arbuscules (Cox et al., 1975). La RMN *in vivo* couplée avec le marquage au  $^{13}\text{C}$  ont démontré que l'hexose était prélevé par le mycélium intra-racinaire des CMA (Shachar-Hill et al. 1995; Solaiman et Saito, 1997; Pfeffer et al., 1997, 1999). Le CMA est alors capable de métaboliser ce carbone principalement ou exclusivement dans le mycélium intra-racinaire en carbohydrates (glycogène et tréhalose) et en TAG (Figure 25) (Pfeffer et al., 1999; revue de Bago et al., 2000). Malgré l'absence de données sur la biosynthèse des stérols intra-racinaires, il est démontré que la biosynthèse des acides gras fongiques (C16:0) a lieu dans le mycélium intra-racinaire. En effet, le marquage des TAG fongiques avec un substrat marqué en  $^{13}\text{C}$  ajouté aux racines mycorhizées suggère qu'une fraction importante des hexoses prélevés est utilisé pour la synthèse des lipides (Pfeffer et al., 1999). De plus, l'obtention d'un marquage par le  $^{13}\text{C}$  du

groupement glycérol et des acides gras des molécules de TAG est en accord avec la métabolisation des hexoses issus des racines hôtes (*via* la glycolyse) en trioses et en acétyl-CoA. Par la suite, les acides gras seraient synthétisés (*via* l'acétyl-coA carboxylase et l'acide gras synthétase), allongés et/ou désaturés et finalement assemblés avec un groupement glycérol grâce aux acyltransférases (Murphy, 1991; Pfeffer et al., 1999; revue de Bago et al., 2000).

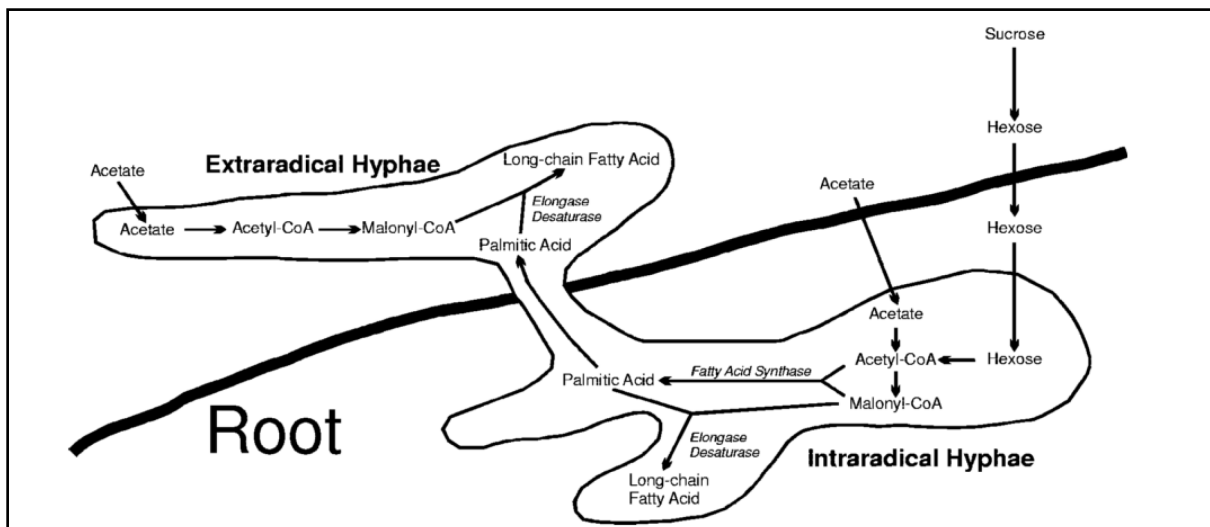


**Figure 24:** Schéma simplifié de l'utilisation des lipides de réserve dans la biosynthèse des hexoses et du tréhalose dans les spores en germination des CMA (d'après Bago et al., 2000).



**Figure 25:** Métabolisme du carbone dans le mycélium intra-racinaire et extra-racinaire. (1): mitochondrie; (2) glyoxysome; (3) globules lipidiques (d'après Bago et al., 2000).

En 2005, les travaux de Trépanier et al. ont montré que l'activité de l'acide gras synthétase avait uniquement lieu dans le champignon intra-racinaire et donc que les acides gras soient uniquement synthétisés dans le mycélium à l'intérieur des racines, ce qui, d'après ces auteurs pourrait être une des raisons de la biotrophie de ces organismes. Les gènes codant pour le complexe enzymatique acides gras synthétase seraient donc exprimés uniquement dans les structures intra-racinaires (Trépanier et al., 2005) mais ceci demande encore à être démontré. Après synthèse, ces acides gras à 16 atomes de carbone (acide palmitique) seraient allongés et/ou désaturés dans le mycélium intra-racinaire comme dans le mycélium extra-racinaire (Figure 26).



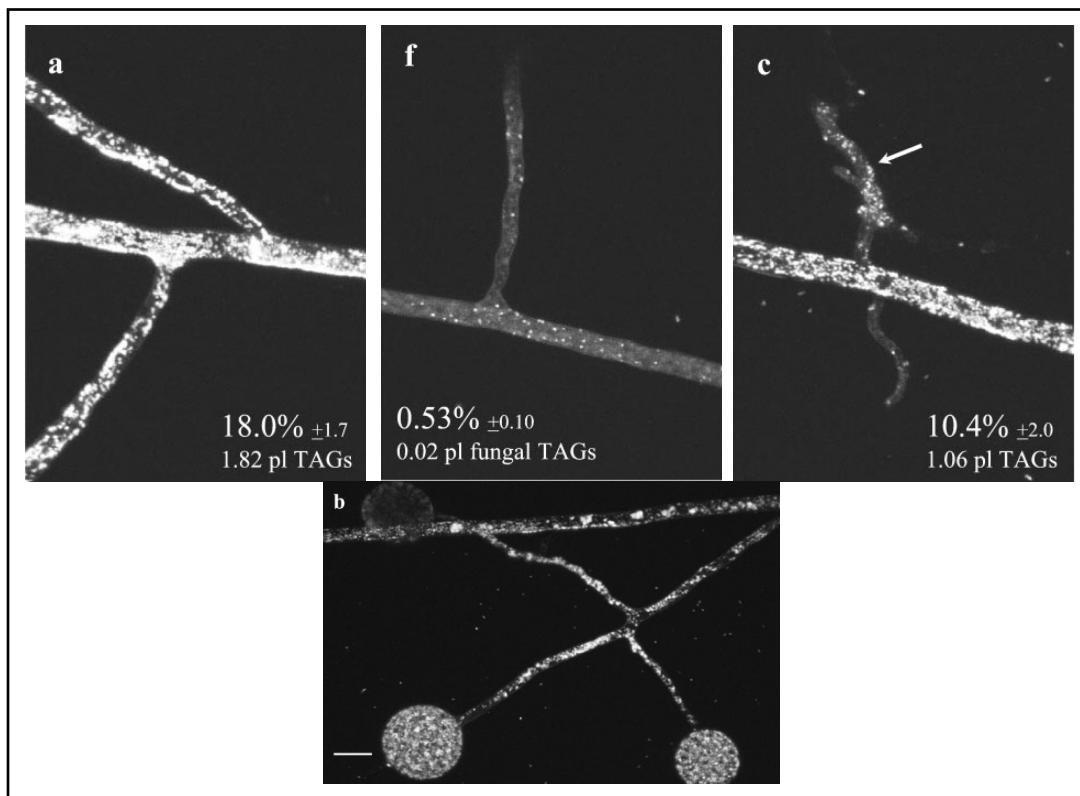
**Figure 26:** Biosynthèse des acides gras par le champignon intra- et extra-racinaire lorsque de l'acétate ou du saccharose sont fournis aux partenaires symbiotiques (d'après Trépanier et al., 2005).

Ainsi, les acides gras associés aux TAG nouvellement synthétisés dans le champignon intra-racinaire seraient ensuite exportés vers le mycélium extra-racinaire où ils sont mis en réserve ou utilisés (Pfeffer et al., 1999; Bago et al., 2002).

### II.2.3. Transport des lipides de réserve du mycélium intra-racinaire vers le mycélium extra-racinaire des CMA

Les CMA transportent leurs lipides de réserve dans des globules lipidiques (Bago et al., 2002a). Le transport des globules lipidiques dans le mycélium extra-racinaire de *Glomus intraradices* DAOM 197198 et *Gigaspora margarita* a été mis en évidence une fois de plus grâce à l'utilisation de cultures monoxéniques et l'utilisation de la microscopie multiphoton *in vivo* (Bago et al., 2002a,b). Dans le mycélium extra-racinaire de *Glomus intraradices*, le volume d'hyphes occupées par les globules lipidiques atteint entre 18 et 24% dans les zones

proches de la racine hôte (donc près de la source de carbone) (Figure 27, photo a). A l'apex du mycélium, ce volume n'atteint plus que 0,5% (Figure 27, photo f). Le volume occupé par les globules lipidiques est également peu élevé dans les hyphes ramifiées (Figure 27, photo c) tandis que l'accumulation est importante dans les spores en formation (Figure 27, photo b) (Bago et al., 2002a). La coloration au rouge de Nile du mycélium extra-racinaire de *Glomus intraradices* DAOM 197198 a montré des mouvements actifs de globules lipidiques dans le sens du mouvement cytoplasmique dans les hyphes exploratoires les plus épaisses ou à contre sens du mouvement cytoplasmique. Enfin, le mouvement le plus rapide dans le mycélium extra-racinaire a été calculé à 4  $\mu\text{m}/\text{sec}$  chez *Glomus intraradices* DAOM 197198 et donc en 24h, les lipides peuvent potentiellement se déplacer de 35 cm (Bago et al., 2002a; Gavito et al., 2005).



**Figure 27:** Observation en microscopie à deux photons des vésicules lipidiques dans le mycélium extra-racinaire de *Glomus intraradices* DAOM 197198 durant la symbiose mycorhizienne (d'après Bago et al., 2002a).

#### II.2.4. Mycélium extra-racinaire

La biosynthèse des lipides dans le mycélium extra-racinaire est sujette à controverse. En effet, les travaux de Beilby (1983) a montré l'incorporation d'acétate marqué [ $1-^{14}\text{C}$ ] dans les TAG, DAG, stérols, PL et acides gras de *Glomus caledonium* après 63h d'incubation. De

même, l'incorporation de ce précurseur a été détectée dans les TAG, DAG, stérols, PL et acides gras de *Glomus intraradices* DAOM 197198 sur une cinétique de 96h (Fontaine et al., 2001a) et dans les acides gras de *Glomus intraradices* DAOM 197198 et *Gigaspora rosea* après 1 semaine d'incubation (Trépanier et al., 2005).

Au contraire, Pfeffer et al. (1999) ont observé très peu ou pas de production de lipides de réserve (TAG) dans les structures fongiques extra-racinaires des CMA après avoir fourni de l'acétate marqué [1 or 2-<sup>13</sup>C] pendant 8 semaines. D'après ces auteurs, les lipides présents dans le mycélium extra-racinaire proviendraient uniquement de leur transport depuis le mycélium intra-racinaire. Comme mentionné par Bago et al. (1999) cette divergence de résultats peut refléter une différence de sensibilité selon les méthodes de radio-traçage ou encore des temps d'incubation dans ces expériences.

Cependant, Gaspar et al. (2001) ont démontré l'activité de deux systèmes enzymatiques impliqués dans la biosynthèse des TAG et leur dégradation. Il s'agit de l'acylglycérol synthétase et de la TAG lipase, présentes dans le mycélium extra-racinaires de *Glomus mosseae*, suggérant que ce champignon est capable de synthétiser ses propres TAG. Ces auteurs ont également suggéré que l'activité hydrolytique des TAG dans le mycélium contribue à l'apport de squelettes carbonés et d'énergie nécessaire pour la synthèse des PL et la formation des membranes et au développement du mycélium (Gaspar et al., 2001). La biosynthèse des lipides de réserve dans le mycélium extra-racinaire des CMA pourrait ainsi résulter de l'estérification des groupements glycérols avec des acides gras pré-existants, allongés et/ou désaturés.

De plus, dans le mycélium extra-racinaire, quand les TAG sont oxydés en acétyl-CoA, celui-ci peut être utilisé pour produire des hexoses *via* le cycle du glyoxylate, pouvant eux-mêmes être utilisés dans la synthèse de tréhalose, de chitine ou d'acides nucléiques (Lammers et al., 2001).

### III. Rôle des lipides chez les CMA et dans l'interaction symbiotique

#### III.1. Rôle des lipides membranaires chez les CMA

De façon générale, les stérols jouent un rôle à la fois structural et fonctionnel au niveau des membranes, en contribuant non seulement à l'architecture mais aussi au bon fonctionnement des membranes plasmiques grâce à la régulation de leur fluidité et leur perméabilité, qui sont corrélées avec la croissance mycélienne et la physiologie du champignon (Weete, 1989; Vanden Bossche, 1990; revue de Sancholle et al., 2001).

L'observation des conidies de *Penicillium italicum* traitées avec de faibles concentrations de fenpropimorphe et d'imazalil (deux fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols) a montré l'accroissement en taille de ces conidies et des tubes germinatifs difformes et raccourcis. Les sporidia d'*Ustilago maydis* apparaissent également gonflées, difformes, multicellulaires et parfois ramifiées en présence de ces composés. De plus, des dépositions irrégulières de  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1, 4 polysaccharides, probablement de la chitine ont été observées, chez les deux organismes, ainsi que l'inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol et l'accumulation de précurseurs stéroliques, comme l'ergosta-8, 14, 24(28)-trien-3 $\beta$ -ol ou l'éburicol chez *Penicillium italicum* (Kerkenaar et al., 1984a,b). Les variations dans la composition et la teneur en stérols de champignons tels que *Candida albicans* et d'autres Mucorales sont à l'origine de changements morphologiques aberrants (Martin et Konopka, 2004; revue de Mysyakina et Funtikova, 2007), ces lipides régulant l'activité d'une enzyme impliquée dans la synthèse de la paroi fongique, la chitine synthétase (revues de Mysyakina et Funtikova, 2007; Mysyakina et Feofilova, 2011). Récemment, il a été montré que l'application de certains fongicides inhibiteurs de biosynthèse des stérols sur un organisme mycorhizien non cible comme *Glomus intraradices/irregulare* DAOM 197198, provoquait l'inhibition du métabolisme des stérols mais aussi du développement du CMA (Campagnac et al., 2009; Calonne et al., 2012).

Les stérols ont aussi un rôle important dans certains domaines membranaires, appelés microdomaines ou « radeaux lipidiques » ou encore « lipid raft ». Il s'agit de petits domaines (10-200 nm) hétérogènes, hautement dynamiques, enrichis en stérols et en sphingolipides et où se déroulent de nombreux processus cellulaires tels que la signalisation hormonale, les trafics cellulaires (endocytose et exocytose), la polarité et la croissance cellulaire ainsi que les



réponses aux stress biotiques et abiotiques (Mongrand et al., 2004; Bhat et Panstruga, 2005; Pike, 2006). Plus récemment, il a été montré qu'ils seraient également impliqués dans la régulation des échanges trophiques de la symbiose mycorhizienne (Doidy et al., 2012). De petits rafts peuvent parfois être stabilisés pour former des plateformes plus grandes dans lesquelles des interactions protéines-protéines ou des interactions protéines-lipides ont lieu (Pike, 2006). L'organisation de la membrane plasmique et la fonction des microdomaines semble être similaire chez différents organismes, des champignons aux mammifères (Alvarez et al., 2007).

Cependant, des domaines riches en stérols ou « sterol-rich domains » (SRDs) spécifiques aux champignons et plus grand en taille que les microdomaines [entre 3 et 15  $\mu\text{m}^2$  pour les SRDs contre 75  $\text{nm}^2$  pour les microdomaines (Edidin, 2003)] ont été identifiés et sont précisément situés à l'extrémité des hyphes croissantes (Alvarez et al., 2007). En effet, chez *Candida albicans*, les domaines riches en stérols ne sont pas détectés dans le champignon sous sa forme bourgeonnante ou s'il développe des « pseudo-hyphes » (chaînes de cellules allongées) mais ces structures ont été observées quand le champignon développe des hyphes (Martin et Konopka, 2004). Par ailleurs, l'altération de la biosynthèse des stérols ou des sphingolipides chez ces champignons coïncide avec l'induction d'une morphologie hyphale aberrante, suggérant que la polarisation de ces domaines riches en stérols serait impliquée dans la morphologie du champignon (Martin et Konopka, 2004). En effet, la composition lipidique spécifique de ces structures permet l'insertion de protéines impliquées dans les voies de transduction du signal, dans l'adhésion cellulaire ainsi que dans d'autres processus de la polarité cellulaire, permettant ainsi de mettre en évidence l'implication des domaines riches en stérols dans la morphogénèse du champignon (Martin et Konopka, 2004).

Par ailleurs, Grille et al. (2010) ont montré que la présence des GS varie suivant les conditions de culture et de stress des souches fongiques étudiées et suggèrent un rôle de ces composés dans la pathogénèse des champignons. Le récent clonage des gènes de la stérol glycosyltransférase ont permis de mieux appréhender les fonctions biologiques de ces composés. Ainsi, des mutants de levure déficients en ergosteryl  $\beta$ -glycoside perdent leur capacité à dégrader leurs peroxyosomes et le champignon phytopathogène *Colletotrichum orbiculare* est affecté dans sa capacité à envahir sa plante hôte (revue de Grille et al. 2010).

Les autres composés membranaires, les PL, sont des composants majeurs et vitaux de toutes les membranes biologiques et jouent un rôle clé dans la transduction du signal, le réarrangement du cytosquelette et le transfert de composés à travers la membrane (Cowan,

2006). Comme rapporté par Mysyakina et Feofilova (2011), ils peuvent servir de chaperons moléculaires en facilitant le repliement des protéines membranaires (Bogdanov et al., 1999), ils participent aux modifications protéiques (Ichimura et al., 2000) et sont le réservoirs de messagers secondaires (Exton, 1990, 1994). En effet, Mysyakina et Feofilova (2011) relatent que tous les messagers lipidiques secondaires proviennent de la PC. La PC peut être hydrolysée en DAG ou AP qui peut elle-même être hydrolysée en lyso-AP. Ces différents composés sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires, dont certaines de lutte contre les stress abiotiques. Il a été montré que la PI et l'AP peuvent jouer un rôle de messagers secondaires chez les plantes (revues de Munnik, 2001; Shao et al., 2007) et les animaux (revue de Vanhaesebroeck et al., 2001). Il a été démontré que l'AP agissait en tant que messenger secondaire pour amplifier ou affiner le signal du stress impliqué dans des processus cellulaires variés comme la défense contre le stress chez les plantes. Cependant, le rôle de l'AP n'est pas connu chez les CMA. Les cibles potentielles de l'AP ont été identifiées comme étant des enzymes essentielles comme les kinases, les phosphatases et les protéines 14-3-3 chez les plantes (Testerink et al., 2004; Boudsocq et Lauriere, 2005). La famille des protéines 14-3-3 chez les plantes joue un rôle central dans la réponse aux stress biotiques, tels que les attaques par des pathogènes bactériens ou fongiques, et abiotiques, tels la fluctuation au niveau de la température et des nutriments, les stress osmotiques et salins (Roberts et al., 2002). Chez *Glomus intraradices* DAOM 197198, le gène *Gi14-3-3* codant pour les protéines 14-3-3, jouerait un rôle dans la protection du CMA contre le stress induit par le déficit hydrique (Porcel et al., 2006).

## III.2. Rôle des lipides en tant que marqueurs spécifiques des CMA

### III.2.1. Stérols

Les stérols majeurs chez les CMA (le 24-éthylcholestérol et le 24-méthylcholestérol) (Beilby, 1980; Beilby and Kidby, 1980b; Grandmougin-Ferjani et al., 1995, 1999) peuvent constituer des marqueurs efficaces de la présence de colonisation racinaire par un CMA. Les racines mycorhizées contiennent des teneurs supérieures en campestérol (24-méthylcholestérol), 24-méthylènecholestérol et 24-méthyl-desmostérol que les racines non-mycorhizées (Nagy et al., 1980; Nordby et al., 1981; Schmitz et al., 1991; Grandmougin-Ferjani et al., 1995; Fontaine et al., 2004). De plus, aucune trace de 24-méthyl/méthylène

stérols n'a été détectée dans les racines infectées par des champignons phytopathogènes, démontrant la spécificité d'un tel marqueur. Il a été, en effet, démontré que les 24-méthyl/méthylène stérols sont les stérols les plus appropriés pour quantifier la colonisation racinaire chez les racines transformées mycorhizées de chicorée ou de carottes cultivées *in vitro* (Fontaine et al., 2004).

### III.2.2. Acides gras

La quantification de la biomasse fongique racinaire en utilisant des marqueurs lipidiques a été décrite tôt par Graham et al. (1995) utilisant les racines de *Citrus* où le teneur de C16:1 $\omega$ 5 était corrélée à la colonisation racinaire.

Cet acide gras C16:1 $\omega$ 5 est normalement absent chez les champignons (Lösel, 1988; Müller et al., 1994; Jansa et al., 1999) excepté chez *Pisolithius tinctorius* (Campos et al., 2008) et à l'état de traces dans les basidiocarpes du champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* (Reich et al., 2009) mais il est présent chez certaines bactéries, comme les spirochètes, bactéries Gram- (Livermore et al., 1969; Nichols et al., 1986; Frostegård et al., 1993) et également chez certaines plantes vasculaires primitives appartenant aux *Proteaceae*, *Ginkgoaceae* et *Euphorbiaceae* (Gellerman et Schlenk, 1963; revues de Cronquist, 1968; Thorne, 1992). Cependant, les lipides neutres n'étant pas d'importants composés de stockage chez les bactéries, la quantité du C16:1 $\omega$ 5 associé aux lipides neutres (AGLN) des bactéries est très faible dans les sols (revues de Olsson, 1999; Van Aarle et Olsson, 2008), ce qui en fait un marqueur d'endomycorhization très sensible (Graham et al., 1995; Olsson et al., 1995; Larsen et al., 1998; Jansa et al., 1999; Olsson, 1999; Van Aarle et Olsson, 2003).

L'acide gras C16:1 $\omega$ 5, et plus précisément quand il est associé aux PL (AGPL), est utilisé pour l'évaluation de la biomasse des CMA et plus précisément des *Glomus* dans les sols et dans les racines tandis que cet AGLN peut permettre l'évaluation de la capacité de stockage du champignon (Olsson et al., 1995; Olsson, 1999; Balsler et al., 2005; Nilsson et al., 2005; Ngosong et al., 2010). Van Aarle et Olsson (2003) ont étudié la distribution du C16:1 $\omega$ 5 à l'intérieur des fractions lipidiques fongiques et ont proposé d'utiliser le ratio AGLN/AGPL pour l'évaluation directe de la capacité de stockage des CMA.

Enfin, Olsson et al. (1995) rapportent une corrélation intéressante entre la longueur des hyphes du CMA dans le sol et la combinaison de l'acide gras C16:1 $\omega$ 5 avec l'acide gras polyinsaturé C20:5.

### III.3. Rôle des lipides dans l'interaction symbiotique

Comme rapporté par Bucher (2010), les stéroïdes végétaux pourraient jouer un rôle important dans de nombreux aspects de la symbiose mycorhizienne, incluant la pénétration hyphale dans la racine et la formation des arbuscules. En effet, les stérols pourraient intervenir en tant que « *Myc factors* » capables d'induire de nombreux gènes végétaux impliqués dans l'établissement de la symbiose. Ces derniers seraient impliqués par exemple, dans la pénétration hyphale ou la formation des arbuscules (Bucher, 2010). Parmi ces gènes, le gène *MtMSBS1*, codant pour une protéine membranaire de type « *Steroid binding protein* » chez *Medicago truncatula* pourrait participer à des transductions de signaux (par fixation aux stérols) et contrôler entre autres, la biosynthèse des stérols par une régulation des cytochromes P450 localisés dans le réticulum endoplasmique (Kuhn et al., 2010). Ces auteurs soulignent l'importance majeure de l'homéostasie des stérols chez la plante dans l'établissement symbiotique. Cette hypothèse avait été émise précédemment par Campagnac et al. (2008) qui par des modifications de la composition stérolique racinaire par un inhibiteur de la biosynthèse des stérols, le fenpropimorphe, avaient soulevé l'importance des stérols dans l'établissement symbiotique. D'après Kuhn et al. (2010), l'invagination de la membrane plasmique et l'installation du CMA dans le cortex racinaire dépendraient du métabolisme stérolique végétal.

Par ailleurs, les lyso-lipides, comme la lyso-PC, issue de l'hydrolyse de la PC est connue pour agir sur l'expression d'un gène codant pour un transporteur de P de manière spécifique au mycorhizes (Drissner et al., 2007). En effet, ces auteurs rapportent que les extraits racinaires de plantes mycorhizées contiennent un signal lipophile capable d'induire les gènes *StPT3* et *StPT4*, codant pour des transporteurs de P chez (*Solanum tuberosum* L.), gènes spécifiquement induits dans les racines colonisées par les CMA. Le même signal cause également une alcalinisation extracellulaire rapide dans des suspensions de cellules de *Solanum lycopersicum* L. et l'induction du gène *LePT4*, codant pour un transporteur de P, uniquement exprimé dans les cellules végétales colonisées. La molécule à l'origine de l'induction de ces gènes a été identifiée comme étant la lyso-PC.

## **IV. Impact des polluants sur le métabolisme lipidique des CMA**

L'impact des polluants sur le métabolisme lipidique des CMA a été peu étudié. Les quelques travaux disponibles sont répertoriés dans la revue de Dalpé et al. (2012) et concernent en particulier certains fongicides et les HAPs. A notre connaissance, l'impact des ETM sur ce métabolisme n'a pas été décrit dans la littérature.

### IV.1. Impact des fongicides

La plupart des fongicides agissent directement sur les fonctions essentielles du champignon phytopathogène comme la respiration, la division cellulaire ou la synthèse des lipides (Leroux, 2003). Parmi les fongicides, les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (IBS) sont les fongicides les plus utilisés en agriculture car ils possèdent un large spectre d'action et induisent peu de résistance chez les agents phytopathogènes fongiques (Hewitt, 1998). Ces IBS inhibent les enzymes de la voie de biosynthèse des stérols, après la formation du squalène (Mercer, 1991, Leroux, 2003). Etant persistants dans l'environnement [temps de demi-vie des fongicides IBS estimé entre 200 jours pour le propiconazole à plus de deux ans pour le flutriafol, l'époxiconazole et le triadimérol (Bromilow et al., 1999)]. C'est ainsi que la pulvérisation répétée des fongicides provoque leur accumulation dans les sols.

L'utilisation de cultures monoxéniques en boîtes bi-compartmentées a permis l'évaluation de la toxicité de trois fongicides IBS, couramment utilisés en agriculture, sur *Glomus intraradices* DAOM 197198: le propiconazole (classe I), le fenpropimorphe (classe II) et le fenhexamid (classe III) en étudiant notamment leur impact sur son métabolisme lipidique.

C'est ainsi que la particularité du métabolisme des CMA décrite précédemment, se traduit par des modifications singulières de leur métabolisme lorsqu'ils sont cultivés en présence de ces trois fongicides IBS. Contrairement aux champignons phytopathogènes, le fenpropimorphe provoque chez *Glomus intraradices* DAOM 197198 une inhibition d'une cible enzymatique inhabituelle, la squalène époxydase et/ou une rétro-inhibition de la synthèse des stérols par les intermédiaires biosynthétiques. Ces inhibitions se traduisent par l'accumulation d'un précurseur de la voie de biosynthèse des stérols, le squalène et la diminution des stérols de fin de chaînes (24-éthylcholestérol et 24-méthylcholestérol)

(Campagnac et al., 2009). Oger et al. (2009) ont montré également des changements des niveaux de transcription d'un gène codant pour une C-4 méthyl stérol oxydase (*GintSMO*) dans le mycélium extra-racinaire de *Glomus intraradices* DAOM 197198 traité par le fenpropimorphe et cultivé *in vitro*.

Le propiconazole provoque quant à lui une inhibition de la stérol 14 $\alpha$ -déméthylase comme chez les champignons phytopathogènes. Cette inhibition chez le CMA a été mise en évidence par une diminution significative des stérols de fin de chaîne (24-éthylcholestérol et 24-méthylcholestérol) et l'accumulation du précurseur stérolique, le 24-méthylènedihydrolanostérol (Calonne et al., 2012). Le propiconazole engendre également de nombreuses perturbations du contenu lipidique fongique (augmentation des acides gras insaturés totaux, de la PC, de la proportion des acides gras saturés des PL) et une augmentation des teneurs en MDA, révélant une peroxydation lipidique chez le CMA cultivé en présence de ce fongicide (Calonne et al., 2010). En revanche, malgré une certaine toxicité sur le développement du CMA, le fenhexamid provoque uniquement une augmentation de la quantité totale en stérols sans modifier la composition stérolique du CMA (Campagnac et al., 2009).

Ces travaux ont permis non seulement d'affiner la voie de biosynthèse des stérols mais aussi de valider les capacités biosynthétiques du CMA décrites dans la partie 3, II.1. En effet, il a été montré que le CMA était capable de synthétiser *de novo* ses propres stérols et que cette biosynthèse est entravée lorsque le champignon est cultivé en présence de ces trois fongicides IBS.

## IV.2. Impact des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs)

En 2006, Verdin et al. ont démontré grâce à l'utilisation du rouge Soudan 7B (colorant spécifique des lipides) et à la propriété d'autofluorescence des HAPs, que ceux-ci sont bioaccumulés dans les globules lipidiques de hyphes et des spores de *Glomus intraradices* DAOM 197198 cultivé *in vitro*. Par ailleurs, un effet négatif des HAPs sur le développement de ce même CMA a été mis en évidence par la mesure de la germination des spores, de la colonisation racinaire et de la croissance extra-racinaire (longueur des hyphes extra-racinaires, sporulation) (Verdin et al., 2006; Debiane et al., 2008, 2009, 2011).

En 2011, l'origine de cette fongitoxicité des HAPs a été recherchée et attribuée à l'induction d'un stress oxydant ainsi qu'à la perturbation du contenu lipidique du CMA

(Debiane et al., 2011). En effet, une importante production de MDA (marqueur de peroxydation lipidique) ainsi que des chutes significatives dans les teneurs, des deux constituants lipidiques membranaires, les stérols (24-méthylcholestérol) et les PL (en particulier la PC) du champignon seraient responsables de cette fongitoxicité. Ils évoquent des dommages au niveau des membranes cellulaires fongiques par le B[a]P et l'anthracène. La chute de PC suggère soit une dégradation accrue de ce PL, ou alors une diminution de sa biosynthèse sous l'effet des HAPs.

L'ensemble de ces données et notamment la production de MDA sont en faveur d'une altération des membranes cellulaires fongiques générée probablement par la surproduction d'ERO au niveau du CMA en présence des HAPs. Ces dommages au niveau membranaire peuvent avoir des conséquences diverses au niveau du fonctionnement de la cellule dont une perturbation de la fluidité membranaire et un dysfonctionnement de certaines enzymes associées aux membranes. Toutefois, une corrélation entre le métabolisme des ERO et celui des stérols a été avancée, récemment, suggérant que la modulation du niveau de stérols pourrait jouer un rôle clé dans l'adaptation au stress oxydant (Branco et al., 2004; Thorpe et al., 2004; Tafforeau et al., 2006).

*Toutefois, ces précédents travaux ont démontré une perturbation des contenus lipidiques du CMA mais ni la cible d'action de ces polluants au niveau du métabolisme lipidique, ni le rôle de ces modifications lipidiques dans la tolérance induit par les HAPs ne sont clairement définis. C'est ainsi que ces aspects seront traités dans le chapitre III de ma thèse et feront l'objet de l'article 1.*

# **La phytoremédiation assistée par les CMA et la dégradation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques**

---

## **I. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs)**

### I.1. Généralités

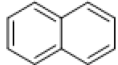
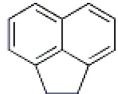
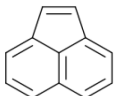
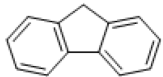
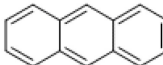





Les HAPs sont issus de la fusion d'au moins deux cycles benzéniques présentant des arrangements linéaires ou angulaires (Sims et Overcash, 1983). Les HAPs de base, constitués uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène sont des molécules organiques neutres et apolaires. Cependant, certains composés aromatiques contenant du soufre, de l'N ou de l'oxygène, leurs sont parfois associés.

Plusieurs centaines de molécules constituent les HAPs mais les différentes études s'intéressent uniquement à 16 d'entre eux retenus comme polluants prioritaires par l'US-EPA (Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis) et par l'EEA (Agence de l'Environnement Européenne) (Keith et Telliard, 1979; International Agency for Research on Cancer (IARC), 1987) (Tableau 3), en raison de leur caractère ubiquiste, de leur abondance, de leur récalcitrance dans l'environnement et de leur caractère cancérigène et/ou mutagène.

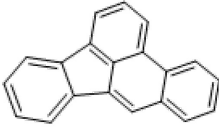
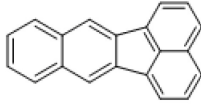
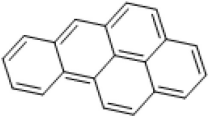



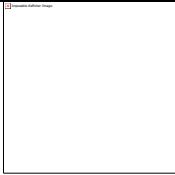
Ces HAPs prioritaires sont composés de 2 cycles benzéniques pour le naphthalène jusque 6 cycles benzéniques pour le benzo[g,h,i]pérylène et l'indéno[1,2,3-cd]pyrène. Le coronène, composé de 7 cycles benzéniques est également beaucoup étudié (Tableau 3).



*Synthèse bibliographique*  
Partie 4: La phytoremédiation assistée par les CMA et la dégradation des HAPs

HAP	Formule chimique	Structure	M (g/mol)	Point de fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)	Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/l)	Coefficient de partage octanol/eau (Log K <sub>ow</sub> )	Demi-vie dans les sols	Classe IARC
Naphtalène	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>		128,2	80	218	31,7	3,37	20-50 jours	2B
Acénaphène	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>		154,2	95	279	3,42-3,9	3,92-3,98	-	3
Acénaphylène	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>		152,2	78-82	280	16,1	4,07	-	-
Fluorène	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>		166,2	114-117	295-298	1,68-1,9	4,14-6,58	30-60 jours	3
Anthracène	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>		178,2	215-218	340-342	1,29	4,45-4,8	2-20 mois	3
Phénanthrène	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>		178,2	99,24-101	338-340	0,98-1,18	4,45-4,57	2-200 jours	3
Fluoranthène	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>		202,3	107-110,19	384	0,20-0,27	4,9-5,2	30-60 jours	3
Pyrène	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>		202,3	150,4-156	396-404	0,13-0,16	4,88-5,18	1-5 ans	3
Chrysène	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>		228,3	254-258	441-448	0,002	5,16-5,86	1-3 ans	2B
Benz[a]anthracène	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>		228,3	160,7	438	0,0057-0,0094	5,61-5,91	1-3 ans	2B

*Synthèse bibliographique*  
Partie 4: La phytoremédiation assistée par les CMA et la dégradation des HAPs

<b>Benzo[b]fluoranthène</b>	$C_{20}H_{12}$		252,3	167-168	487	0,001	5,78-6,04	1-2 ans	2B
<b>Benzo[k]fluoranthène</b>	$C_{20}H_{12}$		252,3	215,7-217	480-481	0,0008	6,06-6,21	2-6ans	2B
<b>Benzo[a]pyrène</b>	$C_{20}H_{12}$		252,3	178,1-179,3	310 - 496	0,00162-0,0038	6,06-6,35	2-20 mois	1
<b>Benzo[g,h,i]pérylène</b>	$C_{22}H_{12}$		276,3	278-278,3	500	0,00026-0,0007	6,5-6,9	1-2 ans	3
<b>Indéno[1,2,3-cd]pyrène</b>	$C_{22}H_{12}$		276,3	164	505	0,0002-0,0008	6,58	1-2 ans	2B
<b>Dibenzo[a,h]anthracène</b>	$C_{22}H_{14}$		278,3	263-266,6	498	0,0005	6,75-6,86	1-2 ans	2A
<b>Coronène</b>	$C_{24}H_{12}$		300	437,4-439	525	0,00014	6,5	-	3

**Tableau 3:** Principales propriétés physico-chimiques des 16 HAPs prioritaires définis par l'US-EPA ainsi que le coronène (d'après May et al., 1983; Miller et al., 1985; Mackay et al., 1992; Shuttleworth et Cerniglia, 1995; Feix et Wiart, 1995; Howard et Meylan, 1997; Lide, 2005; O'Neil, 2006; IARC; INERIS 2005; Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, INERIS).

La classification des HAPs selon l'IARC a été mis à jour le 28 juin 2012:

Groupe 1: L'agent est cancérogène pour l'Homme; Groupe 2A: L'agent est probablement cancérogène pour l'Homme; Groupe 2B: L'agent est peut-être cancérogène pour l'Homme  
Groupe 3: L'agent est inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme

## I.2. Propriétés physico-chimiques des HAPs

Les propriétés physico-chimiques des HAPs varient selon leur masse et leur structure moléculaire, le nombre et l'assemblage des cycles benzéniques qui constituent ces molécules. Deux groupes de HAPs sont distingués:

- Les HAPs légers ou de faible poids moléculaire, composés de 2 ou 3 cycles benzéniques, qui possèdent une masse molaire comprise entre 128 et 202 g/mol. Excepté pour le naphthalène et l'acénaphthylène dont la solubilité est élevée (31,7 et 16,1 mg/l) et le fluoranthène dont la solubilité est très faible (environ 0,2 mg/l), la solubilité des HAPs de faible poids moléculaire est comprise entre 1 et 4 mg/l. Leur coefficient de partage octanol/eau ( $\log K_{ow}$ ) est compris entre 3,37 et 5,2 et leur temps de demi-vie est estimé entre 1 et 7 mois (Tableau 3). Ce coefficient correspond au rapport entre la concentration à l'équilibre d'une molécule dans l'octanol et la concentration de cette même molécule dans l'eau ([www.dictionnaire-environnement.com](http://www.dictionnaire-environnement.com)), ce qui permet de déterminer le caractère hydrophobe ou hydrophile de cette molécule. Il donne également une bonne indication sur la capacité d'un composé à pénétrer les membranes biologiques par exemple et, par conséquent, à s'accumuler dans les organismes vivants.

- Les HAPs lourds ou de haut poids moléculaire, composés de 4 cycles benzéniques ou plus, et qui possèdent une masse molaire comprise entre 200 à 300 g/mol. La solubilité des HAPs de haut poids moléculaire de 4 cycles benzéniques est faible (comprise entre 0,002 et 0,16 mg/l). En revanche, cette solubilité décroît avec l'augmentation du nombre de cycles (entre 0,004 et  $1.10^{-4}$  mg/l pour les HAPs à 5 cycles ou plus). Leur  $\log K_{ow}$  est compris entre 4,9 et 6,5 et leur temps de demi-vie est estimé entre 1 et 6 ans (Tableau 3).

La solubilité des HAPs est un bon indicateur de leur tendance à être entraînés par les eaux du sol. A l'exception du naphthalène et de l'acénaphthylène, les HAPs sont relativement peu solubles dans l'eau. En revanche, étant des molécules lipophiles, les HAPs sont fortement solubles dans les solvants organiques. Du fait de leurs propriétés physico-chimiques les rendant hydrophobes et liposolubles, les HAPs peuvent donc s'adsorber sur les matières organiques (Chefetz, 2000), pénétrer dans les organismes et s'y accumuler ou y être métabolisés.

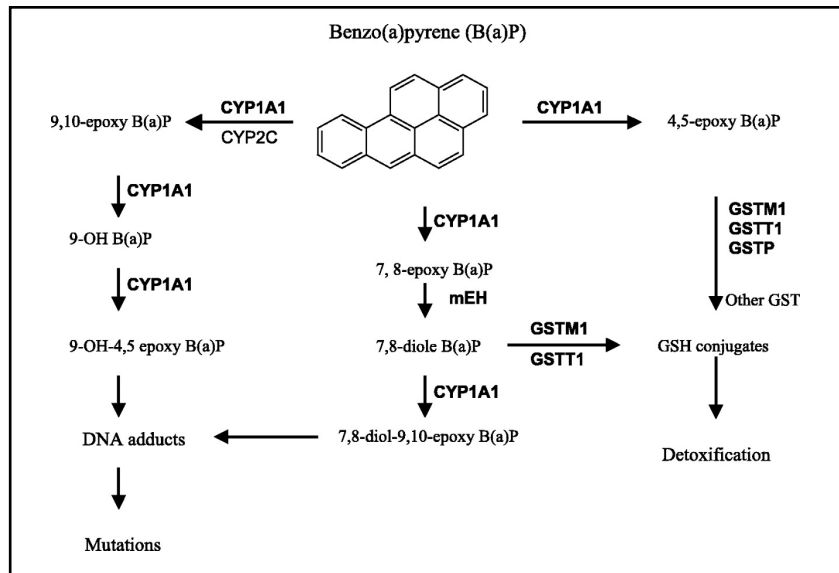
### I.3. Toxicité des HAPs

Chez l'Homme, l'absorption des HAPs peut se faire par voie orale, pulmonaire ou cutanée (Nielsen et al., 1996). Ils sont ensuite largement distribués dans l'organisme *via* le sang et les vaisseaux lymphatiques. C'est la toxicité avérée de certains HAPs, notamment le B[a]P, qui a conduit à leur classement prioritaire par l'US-EPA. De plus, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ainsi que l'IARC ont classé 5 HAPs connus pour être potentiellement dangereux à l'heure actuelle (Tableau 3). Il s'agit des benzofluoranthènes (b et k), du benzo[g,h,i]pérylène, de l'indéno[1,2,3-cd]pyrène, du dibenzo[a,h]anthracène et sont tous composés d'au moins 5 cycles benzéniques. Certains d'entre eux sont d'ailleurs classés 2A et 2B par l'IARC et peuvent donc être cancérogènes pour l'Homme. Le HAP le plus dangereux est le B[a]P, classé dans le groupe 1 par l'IARC et donc démontré comme étant cancérogène pour l'Homme (Tableau 3). Cet HAP est également génotoxique, il est classé mutagène et toxique pour la reproduction (fertilité et développement) [Fiche toxicologique de l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS)].

En revanche, les HAPs de plus faible poids moléculaire, dont l'anthracène, sont classés 3 (effet possible mais pas assez étudié), et correspondent à des composés inclassables quant à leur effet cancérogène pour l'Homme.

De plus, les HAPs possèdent des propriétés immunotoxiques. Ils affaiblissent les réponses immunitaires de plusieurs composants de l'immunité spécifique, l'immunité liée aux cellules de type T et l'immunité humorale (Karakaya et al., 1999).

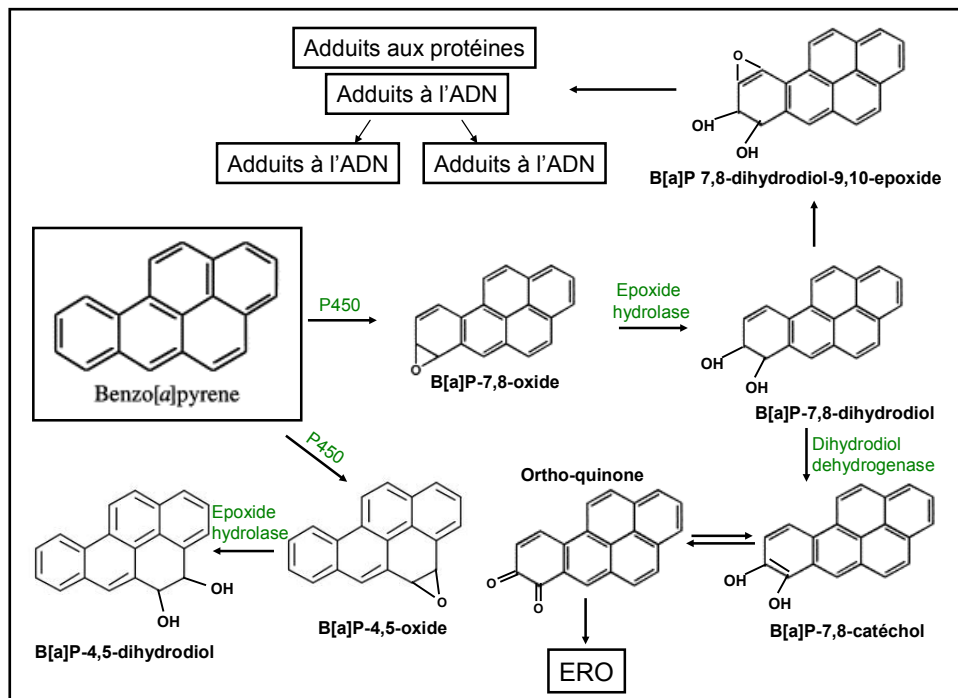
D'autre part, ils peuvent être métabolisés en composés plus hydrosolubles, afin de faciliter leur élimination. La plupart des HAPs sont ainsi excrétés dans les fèces et les urines (Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, Institut National de l'Environnement industriel et des Risques (INERIS)). Cependant, sous l'action d'enzymes, comme des monooxygénases appartenant au groupe des cytochromes P450, des glutathion-S-transférases et des époxydes hydrolases, la formation de dihydrodiols et/ou d'époxydes peut être induite. Le B[a]P peut ainsi être métabolisé en B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (Wislocki et al., 1976; Wood et al., 1976), qui est une molécule très réactive et pouvant se fixer aux macromolécules telles que les protéines, l'ARN ou l'ADN, créant ainsi des mutations irréversibles et induisant la formation de tumeurs (Figure 28).

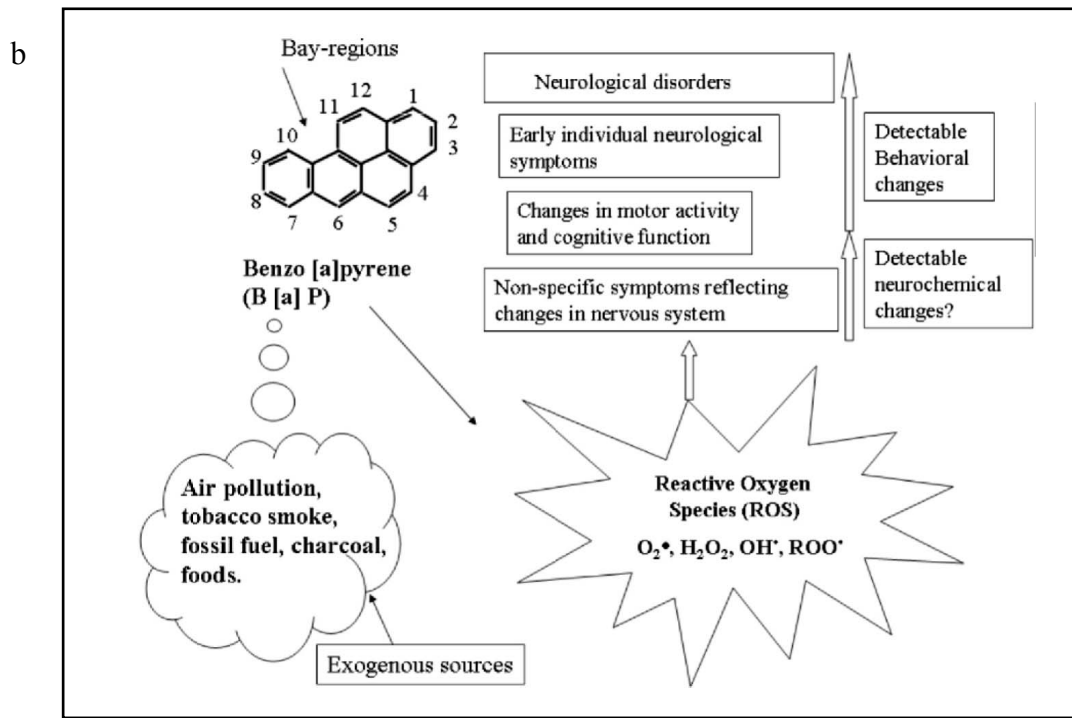


**Figure 28:** Etapes critiques de l'activation et de la détoxification du B[a]P (d'après Lodovici et al., 2004).

Une autre voie de métabolisation des HAPs a été mise en évidence et induit la formation d'ortho-quinones. Cette réaction est catalysée par des dihydrodiol déshydrogénases (Smithgall et al., 1988). Les ortho-quinones peuvent réagir avec un glutathion ou une cystéine pour devenir plus solubles et ainsi être détoxifiées (Smithgall et al., 1988). Cependant, cette transformation est accompagnée de la production d'ERO (revue de Penning et al., 1999), telles que l' $H_2O_2$  ou l' $\bullet OH$ . Ces ERO sont connus pour causer des dommages oxydants au niveau de différentes biomolécules telles que l'ADN, les protéines et les lipides membranaires (revues de Imlay et Lin, 1988; Blokhina et al., 2003) (Figure 29a) ou encore pour engendrer des problèmes neurologiques (revue de Patri et al., 2009) (Figure 29b).

a





**Figure 29:** Schémas présentant les voies métaboliques du B[a]P (a) et le comportement neurotoxique potentiel du B[a]P (b) (d'après Patri et al., 2009).

Dans l'environnement, les HAPs peuvent induire des effets néfastes sur divers organismes vivants, comme les bactéries, les daphnies, les algues, les collemboles, les vers de terre et les plantes et ainsi perturber l'équilibre des écosystèmes, même à de faibles concentrations (Eom et al., 2007; Maliszewska-Kordybach et al., 2007).

L'impact des HAPs sur les végétaux a fait l'objet de quelques travaux. Des diminutions de germination et de croissance, des chutes de rendements, l'apparition de chloroses, des diminutions de l'activité photosynthétique et un stress hydrique peuvent être observés chez les plantes en présence d'HAPs (Bossert et Bartha, 1985; Reilley et al., 1996, Chaîneau et al., 1997; Leyval et Binet, 1998; Richez, 2000; Kummerová et Kmentová, 2004). Les travaux menés à l'UCEIV ont montré que l'introduction d'HAPs, comme l'anthracène ou le B[a]P dans le milieu de culture de racines de chicorée cultivées *in vitro*, inhibe le développement des racines (chutes de la longueur, de la biomasse racinaire et de la quantité protéique) (Verdin et al., 2006; Debiane et al., 2008, 2009). Cette phytotoxicité peut s'expliquer par l'induction d'un stress oxydant, mis en évidence par le dosage du MDA. En lien avec l'accumulation de MDA, des perturbations de teneurs en acides gras (C18:2 et C18:3) ont été observées chez ces racines de chicorée cultivées en présence de B[a]P (Debiane et al., 2012). Par ailleurs, une formation significative d'adduits à l'ADN a été

observée en présence de l'antracène et du B[a]P, démontrant l'effet génotoxique des HAPs (Debiane et al., 2008, 2009). De plus, comme nous l'avons vu dans les parties I et II, quelques travaux ont montré le caractère toxique des HAPs sur le cycle de développement des CMA, pouvant s'expliquer par l'induction d'un stress oxydant et d'altérations membranaires.

#### I.4. Source des HAPs

Les HAPs sont synthétisés lors de la formation des énergies fossiles (pétrole, charbon) ou bien lors de la combustion incomplète de la matière organique (Palayer, 1997). Leur origine peut être naturelle (feux de forêt, activités volcaniques, formation de l'humus, minéralisation de la matière organique et réactions géologiques associées à la formation de fuel fossile et minéral) (revue de Blumer, 1976; Nikolaou et al., 1984; Wilson et Jones, 1993; Hoyau et al., 1996). Les teneurs liées à des sources naturelles telles que les incendies de forêt ou la synthèse par la végétation sont de l'ordre de 0,1 à 1 mg/kg de sol pour la somme des 16 HAPs prioritaires (rapport INERIS). Les HAPs sont principalement issus des activités anthropiques, la production de coke, les transports, les retombées issues des cheminées industrielles, les fuites de produits pétroliers, la fumée de barbecue ou cigarette, l'utilisation de chauffage domestique...(Dennis et al., 1983; Wild et al., 1990).

En France métropolitaine, les émissions des huit HAPs réglementés (fluoranthène, benzo[a]anthracène, benzofluoranthènes (b et k), B[a]P, benzo[g,h,i]pérylène, indéno[1,2,3-cd]pyrène et dibenzo[a,h]anthracène) proviennent principalement de deux secteurs qui sont par ordre d'importance en 2010 (Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA), 2012) (Tableau 4):

- le résidentiel/tertiaire: 48,2 tonnes, soit 59,2% des émissions totales en 2010 (combustion de la biomasse dans les appareils domestiques),
- le transport routier : 25,6 tonnes, soit 31,4%, en particulier les véhicules diesel.

Ces HAPs réglementés correspondent aux huit HAPs couverts par l'arrêté du 2 février 1998 modifié (CITEPA, 2012).

HAP	Transformation énergie	Industrie manufacturière	Résidentiel/ tertiaire	Agriculture/ sylviculture	Transport routier	Autres transports (*)	Total	Hors total (*)
B[a]P	0,1	0,1	4,1	0,1	1,2	0	5,6	1,4
Benzo[b]fluoranthène	0,1	0,1	4,7	0,1	1,5	0	6,6	0,9
Benzo[k]fluoranthène	0,1	0,2	2,9	0,1	1,4	0	4,7	0,5
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	0	0,1	2,4	0,1	1,1	0	3,7	0,6
Benzo[g,h,i]pérylène	0	0,3	1,2	0,2	2,5	0,1	4,3	0,7
Fluoranthène	0,3	2,4	26	1,5	16,4	0,4	47	2
Dibenzo[a,h]anthracène	0,1	0,2	0,4	À	0,2	0	0,9	0
Benzo[a]anthracène	0,7	0,1	6,5	0,1	1,2	0	8,6	0,7
Total	1,3	3,4	48,2	2,3	25,6	0,6	81,4	6,9

**Tableau 4:** Emission dans l'air (en tonnes) des 8 HAPs réglementés en France métropolitaine en 2010. (\*) émissions maritimes internationales, émissions de la phase croisière (> 1000 m) des trafics aériens domestiques et international, ainsi que les émissions des sources biotiques de l'agriculture et des forêts et les émissions des sources non-anthropiques (d'après CITEPA, 2012).

Les HAPs accumulés dans le sol proviennent des dépôts atmosphériques, du ruissellement, des émissions domestiques et industrielles ainsi que du déversement direct de pétrole ou de produits pétroliers.

Pour l'année 2010, les rejets dans l'air de ces 8 HAPs, associés à de fines particules, atteignent plus de 81 tonnes en France métropolitaine. Ces rejets peuvent retomber sur les sols, leur récepteur principal, jusqu'à 1000 kms du lieu d'émission. Cependant, du fait de la grande persistance de ces molécules très stables, la diminution des teneurs au niveau du sol est limitée. En effet, cette matrice est le reflet d'un phénomène cumulatif de la pollution, du fait de la faible dégradation biotique et abiotique de ces molécules au fil des ans [temps de demi-vie estimé à 2 ans pour le naphthalène à plus de 16 ans pour le coronène (Wild et al., 1991a,b)].

### I.5. Teneurs des HAPs dans les sols

Les sols agricoles et urbains contiennent en moyenne une concentration située entre 0,055 et 3,3 mg/kg de sol pour la somme des 16 HAPs prioritaires, mais certaines zones urbaines de grandes agglomérations chinoises contiennent des concentrations en HAPs de l'ordre de 20 mg/kg de sol (Tang et al., 2005; Wang et al., 2007; Jiang et al., 2009).



Contrairement aux zones agricoles et urbaines, peu d'études portent directement sur les sols environnants les zones industriels en activité ou à l'état de friche (Tableau 5). Les concentrations dans les sols de ces zones polluées varient selon le domaine d'activité. De fortes quantités d'HAPs sont retrouvées dans les sols environnants les usines à gaz et celles produisant le créosote. De plus, les concentrations contenues dans les sols d'anciennes cokeries atteignent entre 1000 et 3000 mg/kg. Les manufactures de gaz semblent polluer les sols environnants plus modérément, avec des concentrations retrouvées situées entre 400 et 1000 mg/kg de sol.

Généralement, les concentrations en HAPs dans les sols diminuent de manière exponentielle à la distance de la source émettrice (Crépineau et al., 2003). En effet, les concentrations retrouvées dans les sols aux abords d'une autoroute située en République Tchèque atteignent plus de 3 mg/kg. Ces concentrations chutent en corrélation avec l'éloignement de cette autoroute, jusqu'à atteindre 0,1 mg/kg d'HAPs à 500 m (Tuháčková et al., 2001).

	US-EPA, 1995b	US-EPA 1995a	Ellis et al., 1991	Juhasz, 1998	Mueller et al., 1991	Bewley et al., 1989	Bogan et al., 1999	Erickson et al., 1993	Potin et al., 2004
	"Superfund" Minnesota*	"Superfund" Mississippi*	Production créosote	Site pétrochimique	Entrepôts à bois (utilisation créosote)	Usine à gaz	Fabrique de gaz	Fabrique de gaz	Deux anciennes manufactures de gaz
Naphtalène	6494	673	1131	186	3925			97	0,4-0,2
acénaphène	21319	705		43	1368	2	2	49	1-2
Acénaphthylène	3651	79	33		49		28	28	2 - 2,5
Fluorène	2497	32	650	87	1792	225	4	14	5
Anthracène	1440	2	334	53	3307	156	58	11	35-46
Phénanthrène	7902	266	1595	156	4434	379	51	26	42-72
Fluoranthène	10053	419	682	137	1629	2174	195	73	155-235
Pyrène	9481		642	99	1303	491	173	47	105-174
Chrysène	2392	305	614		481	345	52	15	82-102
Benz[a]anthracène	1670	496		33	171	317	88	16	81-103
Benzofluoranthènes	2271	513			140	498	99	21	83-102
B[a]P	536	224		15	82	92	106	14	97-101
Benzo[g,h,i]pérylène									60-65
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	120	64			23	207	46	7	19-21
Dibenzo[a,h]anthracène	192	27		12		2451		33	63-81
<b>Total</b>	<b>70633</b>	<b>3815</b>	<b>5863</b>	<b>821</b>	<b>18704</b>	<b>7337</b>	<b>974</b>	<b>451</b>	<b>840-1099</b>

**Tableau 5:** Teneurs en mg/kg des 16 HAPs prioritaires classés par l'US-EPA sur différents sites pollués dans le monde.  
 \*: un site 'superfund' correspond à un site pollué identifié comme tel par l'US-EPA, dans le but de prévoir sa dépollution.

	Leyval et Binet, 1998	Joner et Leyval, 2003	Bispo et al., 1999	Joner et al., 2002	Joner et al., 2006	Biache et al., 2008	Joner et Leyval, 2003	Kacálková et Tlustoš, 2011	Rezek et al., 2008
	Usine à charbon	Prélèvement en dehors d'une ancienne usine à charbon	Ancienne cokerie (3 prélèvements)	Ancienne cokerie	Ancienne cokerie	Deux cokeries	Ancienne cokerie	Usine d'incinération de déchets en activité de 1993 à 2002	Bombardement d'une usine fabriquant du feutre bitumé
Naphtalène	304		115 - 753			4-39		< 0,1	3
acénaphène						36-223			4
Acénaphthylène			57-169			29-94			
Fluorène		5	51-92	218	296	26-140	89		3
Anthracène	670	15	103-247	461	81	141-264	244	1	6
Phénanthrène	1617	44	205-419	685	226	80-272	422	6	19
Fluoranthène	3012	72	160-340	493	119	104-153	380	15	103
Pyrène		55	112-242	302	84	87-143	223	10	83
Chrysène	530	41	55-126	269	41	30-75	170	5	19
Benz[a]anthracène	553	44	61-129	196	35	47-104	143	5	22
Benzofluoranthènes		66	68-154	302	77	51-168	198	11	51
B[a]P	521	35	50-102	142	40	34-112	92	9	19
Benzo[g,h,i]pérylène		28	30-206	82	21	18-59	69	9	10
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	340		26-60			26-97		6	11
Dibenzo[a,h]anthracène		0	11-42	0	4	9-19	0		3
<b>Total</b>	<b>8179</b>	<b>405</b>	<b>1251-2897</b>	<b>3130</b>	<b>1024</b>	<b>1270-1402</b>	<b>2030</b>	<b>69</b>	<b>356</b>

**Tableau 5 (suite):** Teneurs en mg/kg des 16 HAPs prioritaires classés par l'US-EPA sur différents sites pollués dans le monde.

\*: un site "superfund" correspond à un site pollué identifié comme tel par l'US-EPA, dans le but de prévoir sa dépollution.

## I.6. Législation et gestion des sols pollués en France

La pollution des sols par les activités industrielles, reconnue comme une question environnementale depuis les années 90, fait l'objet d'une politique de gestion qui s'est d'abord attachée à recenser et hiérarchiser les sites pollués en fonction de leur niveau de pollution intrinsèque, potentiel ou avéré. Deux inventaires nationaux sont accessibles:

- la base de données Basol (<http://basol.environnement.gouv.fr>) recense les sites dégradés, ainsi que les actions de surveillance et de dépollution prévues ou en cours;
- l'inventaire historique Basias (<http://basias.brgm.fr>) met à la disposition des élus locaux, des urbanistes et du grand public une liste de 300 000 sites ayant accueilli des activités industrielles, sources de risques potentiels.

L'approche actuelle de la gestion a évolué pour s'appuyer sur une évaluation des risques en fonction de l'usage qui est fait des sites. Elle met l'accent sur la prévention des pollutions futures, la mise en sécurité des sites identifiés, la surveillance et la maîtrise des impacts sur la santé et l'environnement, le traitement et la réhabilitation des sites pour un usage pérenne, l'implication de tous les acteurs de la société pour éviter qu'un site pollué qui serait réutilisé puisse avoir un impact.

Le Grenelle de l'Environnement compte les sols pollués parmi ses champs d'action: nécessité d'achever l'inventaire des sites pollués « historiques » afin d'établir les priorités d'action en fonction de la localisation (présence de points d'eau, de populations sensibles exposées...); besoin de renforcer les moyens dévolus à l'Etat pour réhabiliter les stations-services fermées et les sites pollués « orphelins ». Ces dispositions ont été reprises dans la loi Grenelle II (art. 43).

A l'heure actuelle, il n'existe pas en France de législation spécifique sur les teneurs maximales en HAPs des sols admises, ni les techniques employées permettant d'évaluer ces teneurs, contrairement à d'autres pays comme les Pays-Bas par exemple. Les seules données disponibles sont les Valeur de Constat d'Impact (VCI), qui interviennent dans la notation de l'impact sur les sols de surface (0-30 cm) et permettent de déterminer si la pollution a un impact sur la santé humaine. Un usage sensible correspond à un usage résidentiel tandis qu'un usage non sensible correspond à un sol en zone industrielle. Cependant, ces valeurs ne constituent en aucun cas des objectifs de réhabilitation.

Des valeurs, dites guides, servant de référence, sont utilisées aux Pays-Bas (Ministère du Logement, de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement (VROM)) et au Québec (Ministère de l'Environnement du Québec) où un seuil est défini, correspondant à la valeur d'intervention au-dessus de laquelle le site doit être dépollué. Le Tableau 6 récapitule les valeurs retenues par ces gouvernements.

Pour les installations classées au titre du Code de l'Environnement, la législation pose le principe de la responsabilité entière et première des exploitants. La loi du 30 juillet 2003 pose le principe de la remise en état après cessation d'activité des terrains occupés par des installations classées en fonction de l'usage et fait intervenir, pour la détermination de l'usage pris en considération, une concertation entre l'exploitant, le propriétaire du terrain et les autorités chargées de l'urbanisme.

Pour les installations nouvelles, l'arrêté d'autorisation détermine les conditions de remise en état. La concertation se déroulera au moment de la procédure d'autorisation. La mise en œuvre de cette disposition impose que l'exploitant recueille l'avis du propriétaire du terrain et des autorités chargées de l'urbanisme sur ce point.

	Valeurs guides hollandaises (1990) (mg/kg de matière sèche)			Valeurs guides hollandaises (1994) (mg/kg de matière sèche)	Critères québécois pour les sols (1988) (mg/kg de matière sèche)			VCI françaises (mg/kg de matière sèche)		
	Seuil de rejet dans les sols	Seuil de transfert de polluants hors du site	Seuil de fabrication, de transformation ou d'utilisation		Niveau A	Niveau B	Niveau C	Usage sensible	Usage non sensible	
Naphtalène	0,01	5	50		0,1	5	50	46	Pv1	
Fluorène						10	100			
Phénanthrène	0,1	10	100			5	50			
Anthracène	0,1	10	100			10	100	Pv1	Pv1	
Fluoranthène	0,1	10	100			10	100	6100	Pv1	
Pyrène						10	100			
Benzo[a]anthracène	0,01	5	50			1	10	13,9	252	
Chrysène	0,01	5	50			1	10	10350	25200	
Benzo[a]pyrène	0,1	1	10					7	25	
Benzo[g,h,i]pérylène	10	10	100							
Benzo[k]fluoranthène	10	5	50					900	2520	
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	10	5	50					16,1	252	
Somme des HAPs	1	20	200	40*		1	20	200		

**Tableau 6:** Valeurs guides hollandaises (1990), québécoises et VCI françaises pour différents HAPs classés prioritaires par l'US-EPA. Pv1: pas de valeur limite. Pour les critères québécois, le niveau A représente le bruit de fond ou la limite de détection du contaminant. Le niveau B constitue le seuil de contamination pour lequel des analyses approfondies sont nécessaires et à partir du niveau C, des techniques de dépollution doivent être mises en œuvre.  
\*La valeur hollandaise de 1994 pour tenir compte des risques sanitaires est en réalité non pas 40 ppm mais 1000 ppm pour la somme de 10 HAP. Cette valeur de 40 ppm a été fixée en tenant compte des résultats de tests écotoxicologiques (d'après Costes et Druelle, 1997).

En raison de la concentration importante en HAPs retrouvée dans les sols, même éloignés des sources émettrices, la nécessité de remédier aux sols pollués par les HAPs devient une préoccupation majeure de autorités publiques. Il existe différentes méthodes de dépollution des sols, plus ou moins efficaces selon la nature du polluant, le niveau et l'âge de la pollution et les propriétés physico-chimiques du sol concerné (Riser-Roberts, 1998). Il existe les méthodes physico-chimiques réalisées soit *in situ* (ou sur site, le sol restant en place) ou *ex situ* (sol excavé déplacé hors du site ou non). Ces techniques consistent en l'évacuation, le piégeage, le traitement avec des produits chimiques. Cependant, ces techniques peuvent modifier les caractéristiques physico-chimiques et biologiques du sol.

A côté des méthodes physico-chimiques, il existe également les méthodes biologiques, qui utilisent les capacités des organismes vivants pour la remédiation des sols pollués et qui sont plus en adéquation avec le développement durable. Parmi elles, la phytoremédiation offre l'avantage d'être plus économique et plus écologique que les méthodes de l'ingénierie physico-chimiques (Rugh, 2004). En outre, elle offre la possibilité de réaliser des traitements *in situ* de grande superficie de sols contaminés. Cette phytotechnologie peut aussi être utilisée sur site après excavation de la terre contaminée, en complément d'autres techniques de remédiation ou dans une phase finale de revégétalisation. Elle permet la reconquête des activités de fonctionnalité des sols. C'est également une technique facile à mettre en œuvre basée sur des pratiques agricoles simples nécessitant peu de technicité spécifique. C'est une application qui génère peu de perturbation de sols présentant une bonne intégration paysagère et une bonne acceptation par l'opinion publique.

## **II. La Phytoremédiation des sols pollués par les HAPs**

### II.1. Généralités - Mécanismes

La phytoremédiation consiste en l'utilisation des plantes et des microorganismes qui leur sont associés pour transformer, contenir, immobiliser, inactiver ou dégrader les polluants du sol (revues de Susarla et al., 2002; Pilon-Smits, 2005). La phytoremédiation peut se faire selon différentes techniques (revue de Sterckeman et al. (2012)) (Figure 30):

- La phytostabilisation. Les plantes, éventuellement en combinaison avec des amendements (phytostabilisation aidée), empêchent ou limitent la mobilité des polluants *via* une stabilisation mécanique et (bio)chimique prévenant ainsi le transfert des polluants vers les différents compartiments de l'environnement et dans la chaîne alimentaire (Losi et al., 1994; Pradhan et al., 1998; Macek et al., 2000). Cette méthode est applicable dans le cas où la biodisponibilité des contaminants est réduite et concerne les polluants inorganiques en particulier.
  
- La rhizodégradation (ou phytostimulation). Elle correspond à la dégradation des polluants organiques grâce à la stimulation de l'activité des microorganismes présents dans l'environnement des racines des plantes, la rhizosphère (revue de Cerniglia, 1997; Siciliano et Germida, 1998; Liste et Alexander, 2000).
  
- La phytodégradation. Elle désigne la dégradation des polluants organiques dans la plante elle-même, à travers son activité métabolique, au niveau des parties aériennes et/ou racinaires (ce qui suppose alors l'absorption du polluant au préalable), ou en dehors de la plante *via* la production d'enzymes extra-racinaires (exsudats) (Shimp et al., 1993; Salt et al., 1998; Burken et al., 2000; Macek et al., 2000).
  
- La phytoextraction. Les plantes, *via* leurs racines, absorbent les polluants dans le sol et les transfèrent dans leurs parties aériennes (tiges, feuilles) où ils sont stockés. Cette méthode est principalement utilisée dans le cas de pollution métallique avec des plantes hyperaccumulatrices ou des plantes avec une biomasse importante, pouvant être ensuite valorisées (bois-énergie, compostage, éco-matériaux, méthanisation, biocarburants...) (Kumar et al., 1995; Brooks, 1997).
  
- La phytovolatilisation consiste en la transformation de certains ETM, métalloïdes ou HAPs, en composés volatils (Sandermann, 1994; Schwab et Banks, 1994; Davis et al., 1996; Macek et al., 2000).



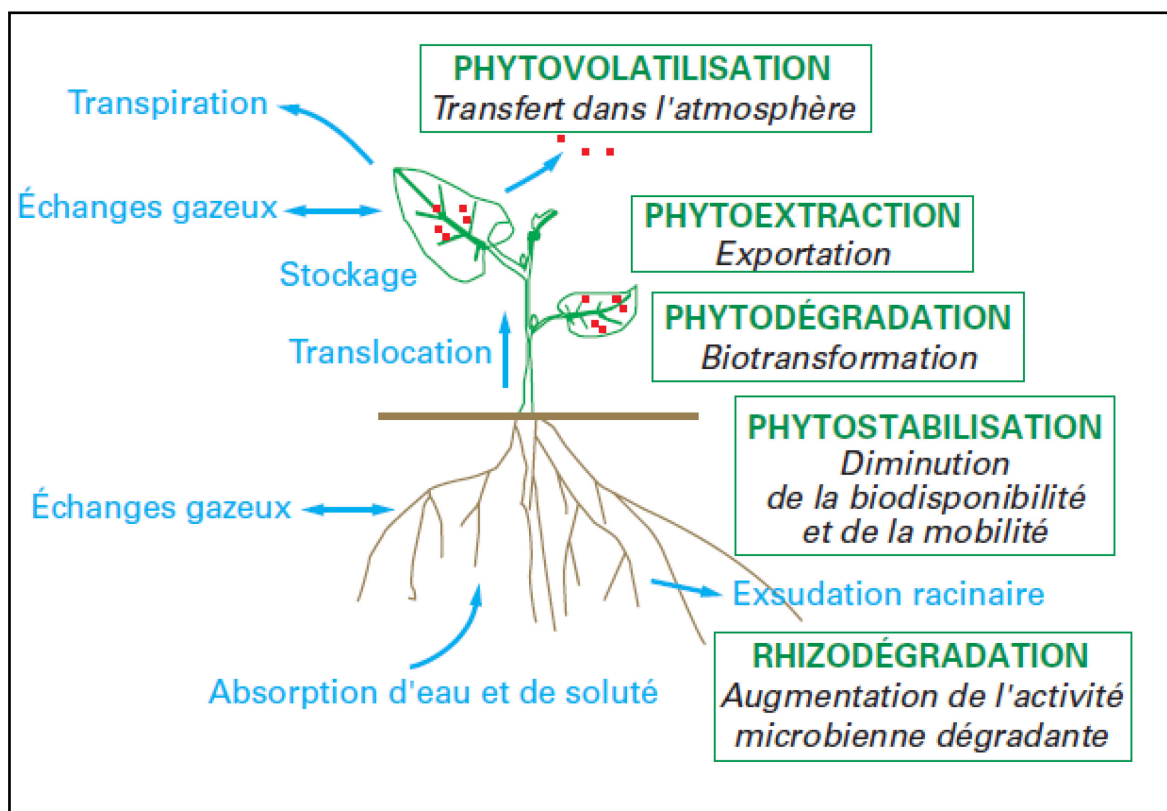


Figure 30: Schéma présentant les principaux procédés de phytoremédiation (d'après Sterckeman et al., 2012).

De nombreux travaux ont montré que la dissipation des HAPs était supérieure dans les sols végétalisés par comparaison aux sols nus (Reilley et al., 1996; Liste and Alexander, 2000; Binet et al., 2000a,b; Wei et Pan, 2010). Néanmoins, cette dissipation accrue des polluants organiques du sol en présence des plantes est souvent attribuée à une stimulation des microorganismes vivants dans la rhizosphère (Mueller et Shann, 2006). Plusieurs processus interviendraient donc dans la dissipation des HAPs par les plantes: l'accumulation et la dégradation par les plantes ainsi que la dégradation par les microorganismes rhizosphériques.

Des expériences en pots et dans des dispositifs à compartiments ont permis de montrer des gradients dans la biodégradation des HAPs dans la rhizosphère. Ainsi, Joner et al. (2001) et Joner et Leyval (2003) ont montré que la biodégradation des HAPs était fonction de la distance aux racines et augmentait lorsque la distance aux racines diminuait. De même, Corgié et al. (2003, 2006), ont observé que la quantité de bactéries dégradantes ainsi que la dégradation du phénanthrène étaient plus élevées dans la section la plus proche des racines de raygrass (*Lolium perenne* L.) (entre 0 et 6 mm de la racine).

Une partie de ces HAPs dissipés serait biodégradée. Les plantes secrètent de nombreuses enzymes pouvant contribuer à la métabolisation des HAPs dans la rhizosphère

(Shimp et al., 1993; Gramss et al., 1999; Wenzel et al., 1999; Macek et al., 2000). Cette détoxification se traduit par l'oxydation du contaminant par des laccases, des peroxydases, des déhalogénases, des déhydrogénases, des nitroréductases et nitrilases, des phénolases ainsi que les cytochromes P450 (Schnoor et al., 1995; Frick et al., 1999; Liste et Alexander, 2000).

La dégradation résulterait aussi indirectement de l'exsudation racinaire de composés stimulant les microorganismes rhizosphériques après revégétalisation des sols contaminés. La rhizosphère est la région du sol proche des racines soumise à l'influence directe des racines (Frick et al., 1999) et donc des exsudats racinaires. Ces derniers contiennent de nombreux composés, tels que des acides aminés, des acides carboxyliques, des polysaccharides de haut poids moléculaire, des composés phénoliques, des vitamines et des enzymes comme les peroxydases et tyrosinases (Singer et al., 2003; Muratova et al., 2009a,b). Ces exsudats permettent à la rhizosphère d'accueillir un nombre de microorganismes bien plus importants (2 à 25 fois plus) par rapport à un sol non rhizosphérique (Bazin et al., 1990) et semblent stimuler les microorganismes dégradants (Miya et Firestone, 2001). C'est le cas par exemple du salicylate qui induit une résistance systémique de la plante (Meyer et al., 1999) et qui est un métabolite intermédiaire de la dégradation du naphthalène par les bactéries. Chen et Aitken (1999) ont montré que le salicylate peut également stimuler la dégradation d'autres HAPs (fluoranthène, pyrène, benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[a]pyrène).

Ainsi, sous l'effet de composés exsudés dans la rhizosphère, les plantes augmenteraient l'abondance des bactéries (Aprill et Sims, 1990; Reilley et al., 1996; Binet et al., 2001), modifieraient les communautés microbiennes présentes (Reilley et al., 1996; Joner et al., 2001; Joner et Leyval, 2003) et stimuleraient l'activité biodégradante microbienne de la rhizosphère (Binet et al., 2000a; Joner et al., 2001). En effet, il est estimé que les activités et populations microbiennes sont de 2 à 100 fois plus élevées dans la rhizosphère par rapport à un sol non rhizosphérique (Bazin et al., 1990; Günther et al., 1996; Atlas et Bartha, 1998). De nombreux HAPs, comme le naphthalène, l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène, le phénanthrène, le B[a]P et le benzo[a]anthracène peuvent être métabolisés par les bactéries rhizosphériques. En effet, les bactéries possèdent des enzymes dioxygénases hydroxylant les cycles aromatiques (RHD<sub>α</sub> pour « ring hydroxylating dioxygenase »), qui introduisent deux atomes d'oxygène sur les HAPs pour former un cis-dihydrodiol (Kim et al., 2006). La RHD<sub>α</sub> hydrolysant les HAPs est la naphthalène-1,2 dioxygénase retrouvée chez *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 (Kauppi et al., 1998) où la sous-unité alpha est codée par le gène *nahAc* (Cébron et al., 2008). D'autres gènes HAP-RHD<sub>α</sub> (*nahA3*, *nagAc*, *ndoB*, *ndoC2*, *pahAc*, *pahA3*, *phnAc*, *phnA1*, *bphAc*, *bphA1*, *dntAc* and *arhA1*) ont été isolés dans de nombreuses

bactéries Gram- et (*narA*-like, *nidA/pdoA1*-like, *phdA/pdoA2*-like and *nidA3/fadA1*) chez les bactéries Gram+ (Habe et Omori, 2003; Cébron et al., 2008).

Par ailleurs, de nombreuses études en sols ont démontré l'efficacité des champignons saprotrophes dans la bioremédiation des sols pollués par les HAPs (Field et al., 1992; revue de Cerniglia, 1997; Verdin et al., 2004; revue de Cerniglia et Sutherland, 2006). Les principaux avantages des champignons par rapport aux bactéries sont leur capacité à se propager dans les sols grâce à leur mycélium et à produire des enzymes extracellulaires peu spécifiques à large spectre d'action. Le B[a]P peut être ainsi dégradé en de nombreux métabolites incluant les quinones, les phénols, les trans- et cis-dihydrodiols, les dihydrodiols époxydes, les isomères de la 7,8-diol-9,10-époxyde, les tétraols, les glucuronides et les sulfates (revue de Cerniglia et Sutherland, 2006).

Deux voies métaboliques interviennent dans la métabolisation des HAPs par les champignons saprotrophes: la voie des enzymes ligninolytiques et celle des enzymes de type monooxygénase à cytochrome P450.

- Chez les champignons de la pourriture blanche ou « white-rot-fungi », les enzymes ligninolytiques sont capables d'oxyder un mélange de polluants environnementaux variés, comme les HAPs (Bumpus, 1989; Haemmerli et al., 1986; Cajthalm et al., 2002a; Haritash et Kaushnik, 2009). Les genres les plus étudiés sont *Phanerochaete chrysosporium* et *Pleurotus ostreatus*, ainsi que *Trametes* et *Bjerkandera*. Les peroxydases (manganèse-dépendante peroxydases et lignine peroxydases), les phenoloxydases (laccases, tyrosinases) ainsi que les enzymes productrices d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont produites en abondance dans le milieu extracellulaire. La production d'enzymes extracellulaires à l'action peu spécifique permet de transformer tous les HAPs et offre un avantage dans le cas où les HAPs sont difficilement disponibles. A l'inverse, ces métabolismes ont pour inconvénients d'être peu rapides et ne permettant pas la dégradation complète du composé (Cerniglia et al., 1994).

- La voie des monooxygénases à cytochrome P450 a souvent été attribuée à d'autres champignons saprotrophes dits non ligninolytiques. En effet, les laccases, lignine peroxydases et peroxydases manganèse-dépendante chez *Fusarium solani* ne sont pas impliquées dans la dégradation du B[a]P, comme il a été démontré par Verdin et al. (2004). En revanche, ce champignon est capable de dégrader les HAPs *via* un système enzymatique intracellulaire faisant intervenir des monooxygénases à cytochrome P450 (Verdin et al., 2005a,b). Peu de souches fongiques autres que les champignons de la pourriture blanche ont été décrites comme capables de métaboliser les HAPs. Le champignon *Cunninghamella elegans*,

appartenant à la classe des Zygomycètes, constitue le modèle d'étude pour les champignons non ligninolytiques (Cerniglia et Gibson, 1979; Pothuluri et al., 1995).

D'autre part, les HAPs peuvent être stockés dans les vésicules lipidiques intracellulaires des champignons saprotrophes indépendamment de la capacité de ces champignons à dégrader les HAPs (Verdin et al., 2005a).

Cependant, même si la dissipation réalisée par les plantes et la rhizosphère qui leurs sont associées (la rhizodégradation) a été démontrée à de nombreuses reprises, très peu de travaux ont été menés sur la dégradation et la production de produits de métabolisation des HAPs par les plantes directement (la phytodégradation). Seuls les travaux de Harms et al. (1977) ont montré que des cultures cellulaires en suspension de *Chenopodium rubrum* mises en présence de B[a]P radiomarqué étaient capables de le métaboliser en B[a]P-3,6-quinone et B[a]P-1,6-quinone, sous l'action du cytochrome P450. De même, Kolb et Harms (2000) ont montré la métabolisation de fluoranthène radiomarqué par 11 espèces de plantes en culture cellulaire en 1-hydroxyfluoranthène, 8-hydroxy-fluoranthène et 3-hydroxyfluoranthène.

La dégradation des HAPs directement par les racines a été quantifiée grâce aux cultures *in vitro*. En effet, les travaux de Verdin et al. (2006), ont montré que les racines de chicorée dégradent autour de 10% de l'anthracène retrouvé dans le témoin abiotique après 6 semaines de culture. Par ailleurs, il a été montré qu'une fraction des HAPs dissipés est bioaccumulée dans les tissus végétaux. En effet, les racines sont capables de prélever et d'accumuler les HAPs présents dans les sols. Des quantités très faibles de l'ordre de 0,8‰ et 17,9‰ de la quantité dans les sols d'anthracène et d'un mélange de 8 HAPs respectivement sont bioaccumulées dans les plantes de raygrass (Binet et al., 2000a). Il semblerait qu'une partie des HAPs dans les sols soit intimement associée avec la matière organique et soit de ce fait non biodisponible pour les racines (Wild et Jones, 1995; Simonich et Hites, 1995). Cependant, Gao et al. (2006) ont évalué cette bioaccumulation de phénanthrène et de pyrène à hauteur de 2,5 et 49% respectivement par rapport à la quantité initiale dans les sols, dans les racines de riz (*Oriza sativa* L.) cultivé dans un sol contaminé avec 200 mg/kg de phénanthrène et de pyrène, après 80 jours de culture en pots. De même, les racines de chicorée (*Cichorium intybus* L.) sont capables de bioaccumuler environ 35% de la quantité résiduelle retrouvée dans les témoins abiotiques (boîtes de Pétri non-inoculées par les racines) (Verdin et al., 2006).

Le contenu lipidique des racines semble influencer sur l'accumulation des HAPs dans ces racines. En effet, une corrélation a été suggérée entre l'absorption de composés organiques

liposolubles, tels que les HAPs et la teneur lipidique des plantes (Simonich et Hites, 1995; Gao et Zhu, 2004).

Néanmoins, même si la dégradation des HAPs semble résulter principalement du consortium plantes/flore rhizosphérique telle que les bactéries et/ou les champignons saprotrophes, la majorité des plantes vasculaires terrestres vivent en symbiose avec des CMA. Ainsi, depuis moins d'une quinzaine d'années, quelques équipes de recherche dont celle de l'UCEIV s'intéressent au rôle de la mycorhization arbusculaire dans la phytoremédiation des sols pollués par les HAPs.

## II.2. Phytoremédiation assistée par les CMA

De nombreux travaux ont montré que l'inoculation par un champignon mycorhizien peut favoriser la dissipation des HAP par divers moyens:

- Par la stimulation de la croissance des plantes. Les racines modifient les propriétés physico-chimiques du sol tant au niveau de sa microporosité que de sa macroporosité (modification de pH, de potentiel redox, de température, d'aération, d'humidité, de salinité) conduisant à des modifications des propriétés biologiques et microbiologiques (Joner et Leyval, 2003). L'augmentation de la densité des racines peut ainsi profiter indirectement à la dégradation des HAPs.
- Par l'augmentation de la biodisponibilité du P dans le sol et de la nutrition minérale de la plante. La fertilisation en général, et des apports de P en particulier, ont permis d'accroître la dissipation des HAPs (Joner et al., 2002). Ainsi, la colonisation par des CMA, pourrait favoriser la dissipation des HAPs en favorisant la nutrition en P des plantes.
- Par une modification de la structure des communautés microbiennes en présence de mycorhizes (Joner et al., 2001; Joner et Leyval, 2003).
- Par un effet direct possible sur la dissipation des HAPs, qui n'a pas encore été clairement démontré et qui sera abordé dans le chapitre 3 (article 3) de cette thèse.

Cependant, des résultats variables ont été rapportés quant à l'effet des plantes mycorhizées sur la phytoremédiation des sols pollués et semble être sujet à controverse. Différents aspects ont été étudiés :

### II.2.1. Dissipation des HAPs par les mycorhizes arbusculaires

Une meilleure dissipation des HAPs par diverses plantes (luzerne, blé, poireau, soja vert, jute) mycorhizées est décrite dans de nombreux travaux (Tableau 7) (Liu et al., 2004; Rabie, 2005; Cheung et al., 2008; Liu et Dalpé, 2009; Gao et al., 2011). Cette dissipation accrue semble être attribuée pour certains de ces travaux à un effet indirect du CMA qui contribue à améliorer les conditions physico-chimiques de la rhizosphère et par conséquent à modifier les communautés microbiennes associées à celle-ci (Joner et al., 2001; Joner et Leyval, 2003). En effet, le CMA *Glomus mosseae* BEG69 induit l'augmentation des populations bactériennes dégradantes et l'expression du gène de la naphthalène dioxygénase dans la mycorhizosphère des plantes (Corgié et al., 2006).

En revanche, d'autres travaux ont montré une dissipation identique des HAPs entre des plantes mycorhizées et non-mycorhizées chez le raygrass, l'aubergine et le maïs (Binet et al., 2000; Rabie, 2005; Corgié et al., 2006; Wu et al., 2011).

Enfin certaines études rapportent une dissipation plus faible du B[a]P et du phénanthrène (uniquement à 10-15 cm de la racine) par les plantes de raygrass et d'*Echinochloa polystachya* mycorhizées (Alarcón et al., 2006; Corgié et al., 2006).

Il est cependant important de noter que pour un même HAP ou mélange d'HAPs étudiés, la durée de la culture (Joner et al., 2001; Joner et Leyval, 2003) et la distance de la pollution à la racine (Joner et Leyval, 2003; Corgié et al., 2006) semblent avoir un effet sur la dissipation. De même, dans des conditions de cultures similaires, selon l'HAP étudié et selon les concentrations appliquées, la dissipation de ces HAPs peut varier (Yu et al., 2011).

### II.2.2. Bioaccumulation des HAPs dans les racines et les CMA

Comme l'ont démontré Verdin et al. (2006) à l'UCEIV, une fraction des HAPs dissipés est bioaccumulée dans les tissus végétaux et fongiques, et plus précisément dans les globules lipidiques. Ceci a été mis en évidence grâce à la propriété d'autofluorescence des HAPs et à l'utilisation d'un colorant spécifique des lipides, le rouge Soudan (Verdin et al., 2006). Ces auteurs rapportent une bioaccumulation plus faible dans les racines mycorhizées cultivées *in vitro* par rapport aux racines non-mycorhizées (Tableau 7) suggérant une stratégie déployée par le CMA *Glomus intraradices* DAOM 197198 pour conférer une protection aux racines.

En revanche, d'autres auteurs décrivent une bioaccumulation plus élevée dans les racines des plantes de luzerne, blé, soja vert et de maïs mycorhizées (Rabie, 2005; Wu et al., 2011), suggérant soit un transport accru des hyphes extra-racinaires vers les racines, soit une plus grande biodisponibilité des HAPs quand les racines sont mycorhizées probablement en relation avec la nature des exsudats racinaires.

Enfin, l'accumulation des HAPs est identique dans les racines d'aubergine colonisées par *Glomus mosseae* et *Glomus etunicatum* (Rabie, 2005; Gao et al., 2011), suggérant l'absence de transport des polluants des hyphes extra-racinaires jusqu'aux racines hôtes.

Une fois de plus, dans des conditions de culture similaires, l'accumulation des HAPs dans les racines varie selon les HAPs étudiés (Binet et al., 2000; Yu et al., 2011). En effet, quand les plantes de raygrass sont cultivées sur un sol contenant uniquement de l'anthracène, l'accumulation dans les racines mycorhizées ou non est identique tandis qu'elle est supérieure dans les racines mycorhizées cultivées sur un sol contenant un mélange d'HAPs (Binet et al., 2000). De même, l'accumulation semble varier selon l'interaction plante/CMA étudiée. Gao et al. (2011) ont montré une accumulation identique de phénanthrène dans les racines de luzerne quand la plante est colonisée soit par *Glomus mosseae* soit par *Glomus etunicatum* seul par rapport aux racines non mycorhizées tandis qu'elle augmente quand les racines sont colonisées par les deux CMA en même temps.

### II.2.3. Transfert des HAPs aux parties aériennes de la plante

Certains travaux ont montré un transfert des HAPs dans les parties aériennes des plantes non-mycorhizées, alors qu'aucun HAP n'a été détecté dans les parties aériennes des plantes de raygrass se développant sur un mélange d'HAPs et colonisées par *Glomus mosseae* (Tableau 7) (Binet et al., 2001). Ces mêmes auteurs ainsi que Wu et al. (2009a), Gao et al. (2011) ont également montré un transfert plus faible dans les parties aériennes des plantes de luzerne et de raygrass colonisées par *Glomus mosseae*, *Glomus etunicatum* seuls ou inoculés ensemble dans le sol.

En revanche, une concentration plus élevée de pyrène a été mesurée dans les tiges des plantes de raygrass (uniquement pour la concentration 100 mg/kg) et de maïs colonisées par *Glomus mosseae* (Wu et al., 2011; Yu et al., 2011).

Enfin, d'autres travaux rapportent un transfert d'HAPs dans les parties aériennes identique, que les plantes de, blé, soja vert et aubergine soient mycorhizées ou non (Rabie, 2005).

Le transfert des HAPs dans les parties aériennes des plantes mycorhizées ou non semble également varier selon l'HAP étudié et selon la concentration appliquée (Wu et al., 2011; Yu et al., 2011).

Les nombreuses divergences entre les résultats portant sur la dissipation, l'accumulation et le transfert des HAPs aux parties aériennes résultent probablement de plusieurs paramètres dont des différences dans les conditions expérimentales et les techniques de culture employées. De ce fait, ces études ne permettent pas de définir clairement le rôle des CMA dans la dissipation et l'accumulation des HAPs. En effet, ces deux paramètres semblent varier selon la biodisponibilité des HAPs (Chiou et al., 2001; Watts et al., 2006) et leurs concentrations dans le sol; la texture du sol (Nam et Kim, 2002; Gao et al., 2006; Joner et al., 2006; Chiapusio et al., 2007), les plantes et les CMA cultivés (Fismes et al., 2002; Liu et Dalpé, 2009) et probablement les microorganismes rhizosphériques présents.

Les méthodes standardisées, comme les cultures monoxéniques, peuvent ainsi permettre de mieux comprendre les mécanismes intervenant dans l'accumulation et la dégradation des HAPs par les symbiotes en absence de toute activité rhizosphérique. Grâce à ces techniques, les travaux menés à l'UCEIV par Verdin et al. (2006) ont démontré une dégradation de l'anthracène supérieure de plus de deux fois dans les racines mycorhizées par rapport aux racines non-mycorhizées.

*Cependant, à ce jour, aucune étude n'a estimé l'accumulation, ni mis en évidence la métabolisation directe des HAPs par les CMA, ni déterminé de produits de dégradation par les deux partenaires de la symbiose. Cet aspect sera traité dans le chapitre III de ma thèse et fera l'objet de l'article 3.*



Synthèse bibliographique

Partie 4: La phytoremédiation assistée par les CMA et la dégradation des HAPs

Plante	CMA	HAP - concentration	Culture	Temps d'incubation	Dissipation	Accumulation	Référence
Luzerne	<i>Glomus caledonium</i>	B[a]P 1-10-100 mg/kg	En pot (pollution artificielle)	Près de 13 semaines	Supérieure en présence des plantes M par rapport aux NM		Liu et al., 2004
	<i>Glomus etunicatum</i> (BGC USA01)	Phénanthrène 2-5-10 mg/kg	En pot (pollution artificielle)	Environ 8 semaines	Supérieure dans les sols en présence des plantes M par rapport aux NM		Wu et al., 2008
		Phénanthrène 0,37-2,44-4,05-9,46 mg/kg				Supérieure dans les RM par rapport aux RNM	Inférieure dans les parties aériennes des plantes M par rapport aux NM
	<i>Glomus mosseae</i> / <i>Glomus etunicatum</i>	Phénanthrène 103 mg/kg	En pot (pollution artificielle)	4 - 6 - 8 et 10 semaines	Supérieure dans les sols contenant les plantes M par rapport aux NM	Identique dans les racines colonisées par les 2 CMA seuls. Supérieure de 28% dans les racines colonisées par le mélange des 2 CMA.	Identique chez les parties aériennes des plantes colonisées par <i>Glomus mosseae</i> . Inférieure de 20% dans les parties aériennes des plantes colonisées par <i>Glomus etunicatum</i> et le mélange des 2 CMA.
Pyrène 74 mg/kg		Supérieure dans les sols contenant les plantes M par rapport aux NM			Effets plus importants avec la mycorhization des deux CMA		
Raygrass	<i>Glomus mosseae</i> BEG 69	Phénanthrène 500 mg/kg	En pot compartimenté (pollution artificielle)	6 semaines	Inférieure de 6% de la concentration initiale dans les sols contenant les plantes M par rapport aux NM uniquement dans les 10-15 mm du compartiment racinaire		Corgié et al., 2006
	<i>Glomus mosseae</i>	Phénanthrène 50-100-200 mg/kg Pyrène 50-100-200 mg/kg en co-contamination	En pot (pollution artificielle)	Environ 8 semaines	Phénanthrène: Supérieure dans les sols contenant les plantes M par rapport aux NM hormis la concentration à 200 mg/kg  Pyrène: Identique dans les sols contenant les plantes M et NM	Phénanthrène: Identique dans les RM et RNM  Inférieure de 17% dans les parties aériennes des plantes M par rapport aux NM uniquement pour la concentration 100  Pyrène: Supérieure de 47, 26 et 312% dans les RM par rapport aux RNM aux concentrations 50, 100 et 200 respectivement.  Supérieure de 75% dans les parties aériennes des plantes M uniquement pour la concentration 100	Yu et al., 2011

Synthèse bibliographique

Partie 4: La phytoremédiation assistée par les CMA et la dégradation des HAPs

	<i>Glomus mosseae</i> BEG 69	Anthracène 5 g/kg	En pot (pollution artificielle)	Près de 6 semaines	Identique dans les sols contenant les plantes M et les NM	Identique dans les RNM et dans les RM	Binet et al., 2000
		ANT, PHE, FLU, CHR 200 mg/kg chacun  B[a]A, B[k]F, DiB[ah]A, B[ghi]P 50 mg/kg chacun			Identique dans les sols contenant les plantes M et les NM	Inférieure dans les parties aériennes des plantes M  Supérieure dans les R sauf pour phénanthrène et anthracène  Transfert dans les parties aériennes uniquement pour les plantes NM	
Tréfle Raygrass	<i>Glomus mosseae</i> BEG 69	Anthracène 500 mg/kg	En pot (pollution artificielle)	8 et 16 semaines	8 et 16 semaines: Quantité résiduelle identique dans les sols non végétalisés ou végétalisés avec des plantes mycorhizées ou non		Joner et al., 2001
		Chrysène 500 mg/kg			8 semaines: Identique dans les sols contenant les plantes M et les NM		
		Dibenz[a,h]anthracène 50 mg/kg			16 semaines: Supérieure de 17,5% par les plantes M par rapport aux NM		
					8 semaines: Identique dans les sols contenant les plantes M et les NM  16 semaines: Supérieure de 110% par les plantes M par rapport aux NM		
		Sol 1 Sol 2	En pot (pollution historique)	13 et 26 semaines	13 semaines: Identique dans les sols contenant les plantes M et les NM pour les deux sols		Joner et Leyval, 2003
F PHE ANT FLU PYR B[a]A CHR B[a]F+ B[k]F B[a]P B[ghi]P	5 44 15 72 55 44 41 66 35 28	89 422 244 380 223 143 170 198 92 69			26 semaines: Sol 1: Identique dans le sol adhérent et n'adhérant pas aux RM et RNM Supérieure dans le sol adhérent fortement aux RM (rhizoplan)  Sol 2: Dissipation supérieure dans les 3 types de sol (pas adhérent, adhérent aux RM et rhizoplan)		
<b>Blé, Soja vert, aubergine</b>	<i>Glomus mosseae</i>	Anthracène, pyrène et chrysène 500 mg/kg chacun  Benz[a,h]anthracène 50 mg/kg	En pot (pollution artificielle)	Environ 9 semaines	Supérieure de 48 et 77% pour le sol contenant le blé et le soja vert M par rapport aux NM. Identique dans les sol contenant plantes M et NM d'aubergine.	Supérieure de 188% et 234% dans les RM de blé et de soja par rapport aux RNM. Identique dans les RM et RNM d'aubergine.  Identique chez les parties aériennes des trois plantes M ou NM.	Rabie, 2005

Tableau 7: Tableau récapitulatif des travaux portant sur la contribution de la colonisation mycorhizienne dans la dissipation, l'accumulation et la dégradation des HAPs.

Plante	CMA	HAP - concentration	Culture	Temps d'incubation	Dissipation	Accumulation	Référence
<i>Echinochloa polystachya</i>	<i>Gigaspora margarita</i>	B[a]P 0,1-0,2-0,3-0,4 mM	En pot (pollution artificielle)	10 semaines	Inférieure dans les sols contenant les plantes M par rapport aux plantes NM pour les concentrations 0,1, 0,2 et 0,3		Alarcón et al., 2006
Chicorée	<i>Glomus intraradices</i> DAOM 197198	Anthracène 30-140 mg/L	<i>In vitro</i>	6 semaines	Dégradation supérieure de plus de deux fois dans le milieu contenant les RM par rapport aux RNM	Bioaccumulation de l'anthracène dans les globules lipidiques des racines et du CMA. Inférieure de 20% dans les RM par rapport au RNM	Verdin et al., 2006
Jute	<i>Glomus mosseae</i> / <i>Glomus intraradices</i>	Anthracène 50-100-150 mg/kg	En pot (pollution artificielle)	5 semaines	Identique dans les sols contenant les plantes M et NM pour la concentration 150 mg/kg Supérieure dans les sols contenant les plantes M par rapport aux NM pour les concentrations de 50 et 100 mg/kg		Cheung et al., 2008
Poireau	<i>Glomus intraradices</i> DAOM 197198 <i>Glomus versiforme</i>	Phénanthrène Anthracène 3,5-7-10,5 g/kg	En pot (pollution artificielle)	12 semaines	Supérieure dans les sols contenant les plantes M par rapport aux NM		Liu et Dalpé, 2009
Maïs	<i>Glomus mosseae</i>	Phénanthrène 12 mg/kg  Pyrène 7,4 mg/kg	En rhizobox (pollution artificielle)	Environ 8 semaines	Identique dans les sols contenant les plantes M et les NM	Supérieure dans les RM par rapport aux RNM pour les deux HAPs  Supérieure dans les tiges des plantes M par rapport aux NM uniquement pour le pyrène	Wu et al., 2011

**Tableau 7 (suite):** Tableau récapitulatif des travaux portant sur la contribution de la colonisation mycorhizienne dans la dissipation, l'accumulation et la dégradation des HAPs.

M = mycorhizées; NM = non-mycorhizées; RNM = racines non mycorhizées; RM = racines mycorhizées.

F = fluorène; PHE = phénanthrène; ANT = anthracène; FLU = fluoranthène; PYR = pyrène; B[a]A = Benzo[a]anthracène; CHR = chrysène; B[a]F+B[k]F = Benzo[a]fluoranthène + Benzo[k]fluoranthène; B[a]P = Benzo[a]pyrène; B[ghi]P = Benzo[g,h,i]pérylène.

# Chapitre II

---

## Matériels et Méthodes



## I. Matériels

### I.1. Matériels biologiques

#### I.1.1. Matériel fongique : champignon mycorhizien à arbuscules *Rhizophagus irregularis*

La souche de champignon mycorhizien à arbuscules (CMA) utilisée lors de ce travail est *Rhizophagus irregularis*, référencée DAOM 197198 (Chabot et al., 1992). La souche nous a aimablement été fournie par le G. Bécard, Université Paul-Sabatier à Toulouse, France. Selon la classification de Schüßler et al. (2001) et les modifications apportées par Schüßler et Walker (2010), ce CMA appartient à:

Division: *Eumycota*  
Embranchement: *Glomeromycota*  
Classe : *Glomeromycètes*  
Ordre: *Glomérales*  
Famille: *Gloméracées*  
Genre: *Rhizophagus*  
Espèce: *Rhizophagus irregularis*

#### I.1.2. Matériel végétal: racines de chicorée (*Cichorium intybus* L.)

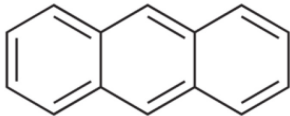
Les expériences réalisées dans le cadre de cette thèse ont été menées sur des cultures axéniques de racines de chicorée (*Cichorium intybus* L.) de la variété Orchies, transformées par *Agrobacterium rhizogenes* (Fontaine et al., 2004) et colonisées ou non par le CMA *Rhizophagus irregularis*. Les graines de chicorée, ayant données des plantules et des racines qui ont servies à la transformation, proviennent de la société Florimond-Desprez et ont été fournies au laboratoire dans le cadre d'un programme d'amélioration des plantes.

*Cichorium intybus* L. est une espèce diploïde ( $2n = 8$ ) dont la taxonomie est la suivante:

Classe: *Magnoliopsida*  
Ordre: *Astérales*  
Famille: *Astéracées*  
Sous famille: *Cichoridées*  
Genre: *Cichorium*  
Espèce: *Cichorium intybus* L.

## I.2. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs)

Les HAPs utilisés lors de cette étude sont l'anthracène (HAP de faible poids moléculaire) et le B[a]P (HAP de haut poids moléculaire) (Sigma-Aldrich). L'anthracène est un HAP composé de 3 cycles benzéniques, insoluble dans l'eau mais soluble dans la plupart des solvants organiques. Le B[a]P est un HAP composé de 5 cycles benzéniques. A température ambiante ordinaire, le B[a]P se présente sous forme de cristaux jaunes inodores. Il est très peu soluble dans l'eau mais soluble dans de nombreux solvants organiques (Fiche toxicologique de l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), 2007). Leurs structures chimiques ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le tableau 8 [Institut National de l'Environnement et des Risques (INERIS)]:

Caractéristiques physico-chimique	Anthracène	B[a]P
		
Pureté	Minimum 99%	Minimum 97%
Formule chimique	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>
Masse molaire (g/mol)	178.23	252.32
Point d'ébullition (°C)	340.9	475
Point de fusion (°C)	216.4	175
Solubilité dans l'eau (mg/l)	1.29	3.10 <sup>-3</sup>

**Tableau 8:** Structures et caractéristiques physico-chimiques de l'anthracène et du B[a]P.

## II. Méthodes

### II.1. Préparation des cultures monoxéniques

#### II.1.1. Le milieu de culture des racines mycorhizées et non mycorhizées et du CMA

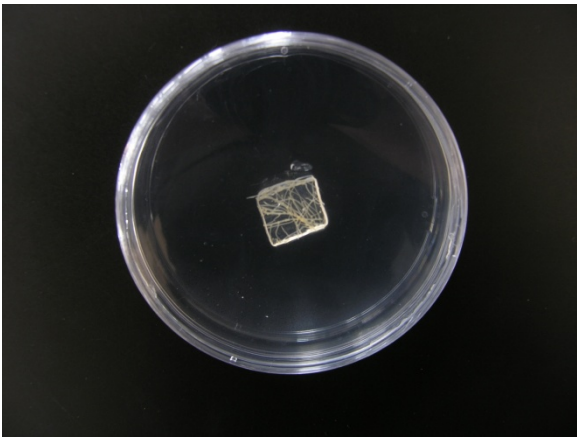
Les racines transformées, mycorhizées ou non et le CMA ont été cultivés sur un milieu M (Tableau 9) contenant ou non les différentes concentrations d'HAPs. Ce milieu est adapté à la fois au développement des racines de chicorée transformées et au développement de certains CMA (Bécard et Fortin, 1988).

<b><u>Composition</u></b>	<b><u>Quantité</u></b>
<b>Macroéléments</b>	
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	731 mg
KNO <sub>3</sub>	80 mg
KCL	65 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,8 mg
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	288 mg
NaFeEDTA	8 mg
KI	0,75 mg
<b>Oligoéléments</b>	
MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	6 mg
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2,65 mg
HBO	1,5 mg
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,13 mg
NaMoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0.0024 mg
<b>Vitamines</b>	
Myo inositol	50 mg
Thiamine hydrochloride	0,1 mg
Pyridoxine hydrochloride	0,1 mg
Acide nicotinique	0,5 mg
Glycine	3 mg
<b>Autres</b>	
Saccharose	10 g
Phytigel	2,5 g

ajustement du pH à 5,6 (KOH) puis ajustement à 1 L d'eau distillée

**Tableau 9:** Composition du milieu M (Bécard et Fortin, 1988).

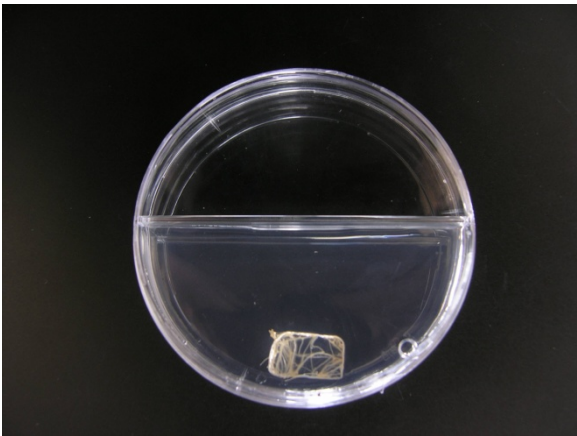




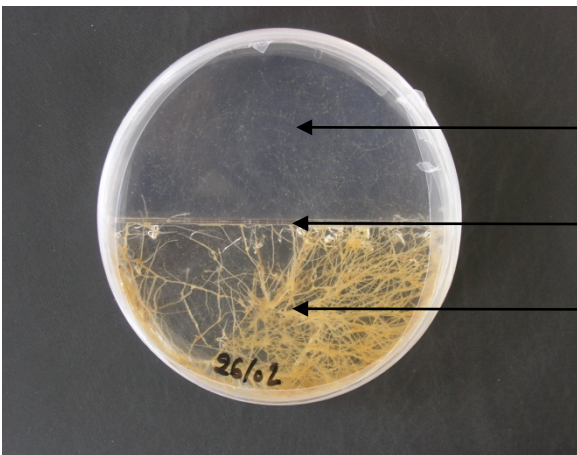
**Photo 1:** Boîte mono-compartmentée contenant du milieu M et inoculée avec un fragment de gélose contenant des racines de chicorée mycorhizées ou non.



**Photo 2:** Culture de racines de chicorée mycorhizées ou non en boîte mono-compartmentée après 9 semaines d'incubation.



**Photo 3:** Boîte bi-compartmentée contenant du milieu M et inoculée avec un fragment de gélose contenant des racines de chicorée mycorhizées.



← Compartiment fongique (CF) (milieu M sans ou avec les HAPs)

← Cloison

← Compartiment racinaire (CR) (milieu M sans HAP)

**Photo 4:** Culture du CMA *Rhizophagus irregularis* en boîte bi-compartmentée après 9 semaines d'incubation.

### II.1.2. Introduction des HAPs dans les milieux de culture

Afin de préparer le milieu contenant les HAPs, l'anthracène et le B[a]P ont été dispersés dans une solution contenant de la gélatine (0.5%) et du NaCl (0.9%) et homogénéisée à l'aide d'une sonde à ultrasons (Sonicator Ultrasonic Processor XL, Misonix Inc, New York, USA) pendant 10 min à température ambiante en conditions stériles. La solution de gélatine/NaCl contenant les HAPs a été ajoutée à raison de 10 ml/l au milieu de culture M autoclavé et solidifié avec le Phytigel, afin d'obtenir les concentrations finales en anthracène et B[a]P de 280  $\mu$ M correspondant respectivement à 50 et 70,8 mg/l et du mélange de ces deux HAPs (50/50). Le témoin a consisté également en un milieu sans HAP contenant le même volume de solution de gélatine/NaCl.

### II.1.3. Préparation des cultures monoxéniques de racines de chicorée mycorhizées ou non, dans le système de culture en boîtes mono-compartmentées

Après agitation, 25 ml de milieu contenant l'anthracène, le B[a]P ou le mélange des deux HAPs ont été coulés de façon stérile dans des boîtes de Pétri standards mono-compartmentées (9 cm de diamètre).

L'inoculation s'est faite grâce au dépôt d'un fragment de gélose contenant des racines de chicorée mycorhizées ou non sur le milieu M contenant ou non l'anthracène, le B[a]P ou le mélange des deux HAPs (280  $\mu$ M). Les boîtes contenant les milieux inoculés ont été incubées à 27°C à l'obscurité pendant 9 semaines (Photos 1 et 2).

### II.1.4. Préparation des cultures monoxéniques de *Rhizophagus irregularis*, dans le système de cultures en boîtes bi-compartmentées

Afin d'obtenir le CMA seul (exempt de racines), le système de cultures en boîtes bi-compartmentées (2 compartiments identiques séparés par une cloison en plastique) (**Photo 3**) a été utilisé. 25 ml de milieu M sans HAP ont été ajoutés dans le compartiment racinaire (CR). L'inoculation des racines mycorhizées s'est faite uniquement dans le CR contenant ce milieu. Après 3 semaines d'incubation à l'obscurité, 30 mL de milieu M contenant ou non l'anthracène, B[a]P ou le mélange des deux HAPs ont été ajoutés dans le second compartiment, c'est-à-dire le compartiment fongique (CF), pour que seul le champignon soit en contact avec les HAPs. La prolifération des racines dans ce compartiment a été empêchée par coupures régulières des racines, afin que celui-ci reste strictement fongique.

Par la suite, les boîtes bi-compartmentées contenant les milieux inoculés dans le CR et les milieux contenant ou non les HAPs dans le CF ont été incubées à 27°C à l'obscurité pendant 6 semaines (Photos 3 et 4).

## II.2. Mesure des développements fongiques

### II.2.1. Longueur des hyphes de *Rhizophagus irregularis*

Après incubation, les longueurs des hyphes du CMA cultivées dans le milieu M en absence et en présence des HAPs ont été estimées de la même façon que la méthode décrite pour l'estimation de la longueur racinaire (Declerck et al., 2003). Le nombre d'intersections entre les hyphes et le quadrillage observé à la loupe binoculaire a été ainsi comptabilisé et ce nombre a été converti en longueur hyphale (en m) grâce à la formule de Newman (1966) :

$$L = \frac{\pi \times N \times A}{2H}$$

où L = Longueur des hyphes (en m)  
 N = Nombre d'intersections  
 A = Surface totale du quadrillage (58, 088 cm<sup>2</sup>)  
 H = Somme de la longueur des lignes du quadrillage (119,2 cm)

### II.2.2. Nombre de spores de *Rhizophagus irregularis*

Afin de déterminer le nombre de spores de *Rhizophagus irregularis*, un quadrillage a également été placé sur les boîtes de Pétri. Le nombre de spores dans chaque case du quadrillage a été comptabilisé. L'addition du nombre de spores de toutes les cases permet d'obtenir le nombre total de spores par boîte.

## II.3. Récolte du matériel biologique

Le Phytigel est un agent solidifiant utilisé dans la préparation de milieu M solide. Il a pour particularité d'être parfaitement translucide et inerte d'un point de vue biologique. C'est un composé constitué d'unités tétrasaccharidiques, qui, sous l'action de la chaleur (autoclave) et en présence de cations divalents se polymérisent et forment un gel. Grâce à ces propriétés, le Phytigel permet un bon suivi de l'état des cultures sous une loupe binoculaire, mais permet surtout de récupérer le matériel biologique dans une solution liquide, composée d'un tampon Tris-HCl (Trizma Base 50 mM - EDTA 10 mM, pH 7,5). Ce tampon chélate les ions divalents

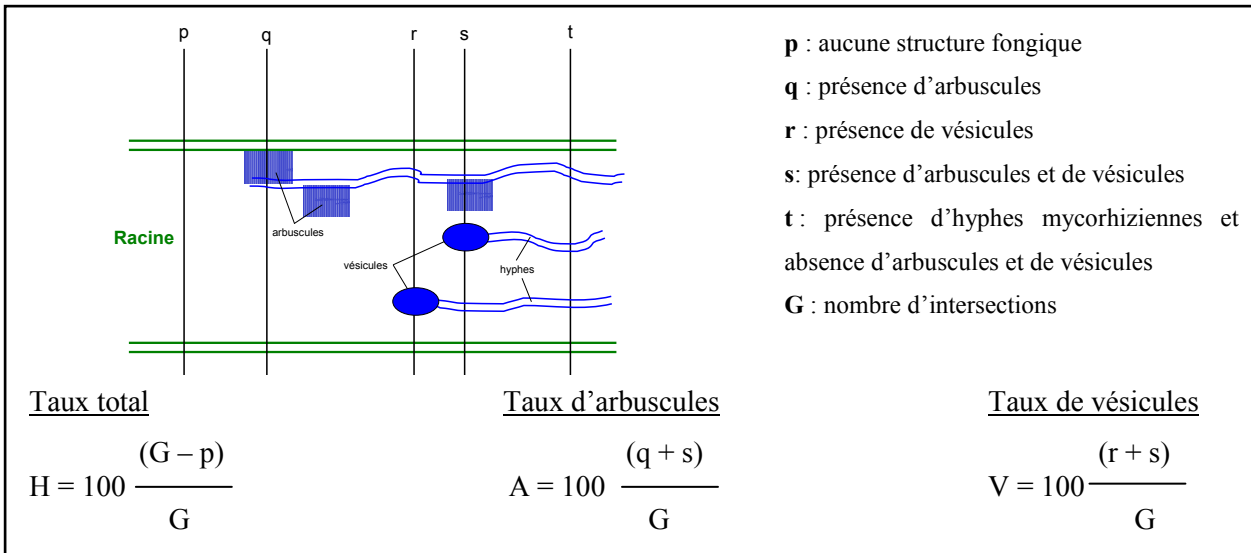
ayant servi à la polymérisation. La solubilisation est réalisée à température ambiante sous agitation magnétique.

- Les racines sont obtenues en filtrant le milieu solubilisé contenant les tissus végétaux à travers un filtre dont le maillage est de 0,1 mm, puis rincées à l'eau distillée et conservées à -80°C, avant d'être lyophilisées ou non pour les différentes expériences. Ainsi, après 24 heures de lyophilisation, les racines ont été pesées. La matière sèche a ainsi été déterminée.
- Le matériel fongique (spores et mycélium) est filtré sur un maillage de 50 µm. Après filtration, le matériel récupéré est rincé à l'eau distillée, puis observé sous loupe binoculaire afin de vérifier l'absence de petits fragments racinaires contaminants. Ces derniers sont alors enlevés à l'aide d'une pince fine. Le matériel fongique récupéré a été conservé à - 80°C, avant d'être lyophilisé ou non pour les différentes expériences.

#### II.4. Détermination des taux de colonisation racinaire par *Rhizophagus irregularis*

Afin de quantifier la colonisation racinaire par le CMA, les racines mycorhizées cultivées dans le milieu M en présence et en absence des HAPs, ont été colorées avec le bleu Trypan (bleu Trypan 0,5g dans 32/32/467 ml d'un mélange d'eau/glycérol/acide lactique) pendant 1 heure à 70°C, après avoir été éclaircies dans une solution de KOH 10% pendant 1 heure à 70°C (Phillips et Hayman, 1970). Les fragments de racines sont conservés dans une solution de glycérol/eau (1/1) à l'obscurité à 4°C pendant 15 jours. Après coloration, 80 fragments racinaires ont été placés entre lames et lamelles et observés au microscope optique (x400). Les structures fongiques observées à l'intersection de l'axe de l'objectif et du fragment racinaire ont été quantifiées (McGonigle et al., 1990). Trois lectures aléatoires par fragment ont été réalisées, soit 240 lectures par traitement au total.

Le pourcentage de colonisation total = (nombre d'intersections observées – nombre d'intersections sans structure fongique) x 100 / nombre d'intersections observées.



## II.5. Analyses biochimiques

### II.5.1. Etude de la biosynthèse des lipides fongiques

Les principales étapes de l'étude de l'impact des HAPs sur la biosynthèse des lipides fongiques sont schématisées dans la Figure 33.

- Introduction de l'acétate marqué dans le milieu de culture contenant le CMA.

L'acétate de sodium marqué [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] a été introduit à raison de  $10\ \mu\text{Ci}$  dans  $200\ \mu\text{l}$  dans le CF de chaque boîte bi-compartmentée. La radioactivité de la solution d'acétate à  $50\ \mu\text{Ci/ml}$  a été évaluée en prélevant  $10\ \mu\text{l}$  de cette solution dans  $10\ \text{ml}$  de liquide de scintillation pour solution aqueuse (Rotiszint Ecoplus ready-to-use, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Allemagne) dans une fiole. La radioactivité a été quantifiée par un compteur à scintillation liquide (Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Counter, Packard Bioscience Company, Waltham, USA).

- Récolte du matériel fongique et analyse de la radioactivité résiduelle dans le milieu de culture.

Après 72h d'incubation, le milieu de culture contenant le CMA dans le CF des boîtes bi-compartmentées a été placé dans un volume de Tris-HCl (Trizma Base  $50\ \text{mM}$  - EDTA  $10\ \text{mM}$ , pH 7,5) comme décrit dans la partie II. 3. Pour chaque traitement en HAP, quatre répliquats composés chacun de 8 boîtes bi-compartmentées ont été utilisés. La radioactivité

contenue dans 1 ml du milieu de culture mélangé au tampon Tris-HCl (Trizma Base 50 mM - EDTA 10 mM, pH 7,5) a été quantifiée par un compteur à scintillation liquide après ajout de 10 ml de liquide de scintillation pour solution aqueuse.

Le matériel fongique récolté (entre 14 et 40 mg) a ensuite été lyophilisé pendant 24h avant la réalisation de l'extraction des lipides.

- Extraction des lipides

Dans un ballon de 50 ml, le matériel fongique a été mélangé à 15 ml d'un mélange de solvants composé de dichlorométhane/méthanol (2/1, v/v) auquel a été solubilisé 0,05% de HTB (hydroxytoluène butylé, Sigma, Tavernier et al., 1993) comme antioxydant, auquel 3 grains de pierre ponce ont été ajoutés. L'extraction des lipides est faite à chaud au bain-marie sous reflux à 70°C pendant 1h dès que le mélange d'extraction bout.

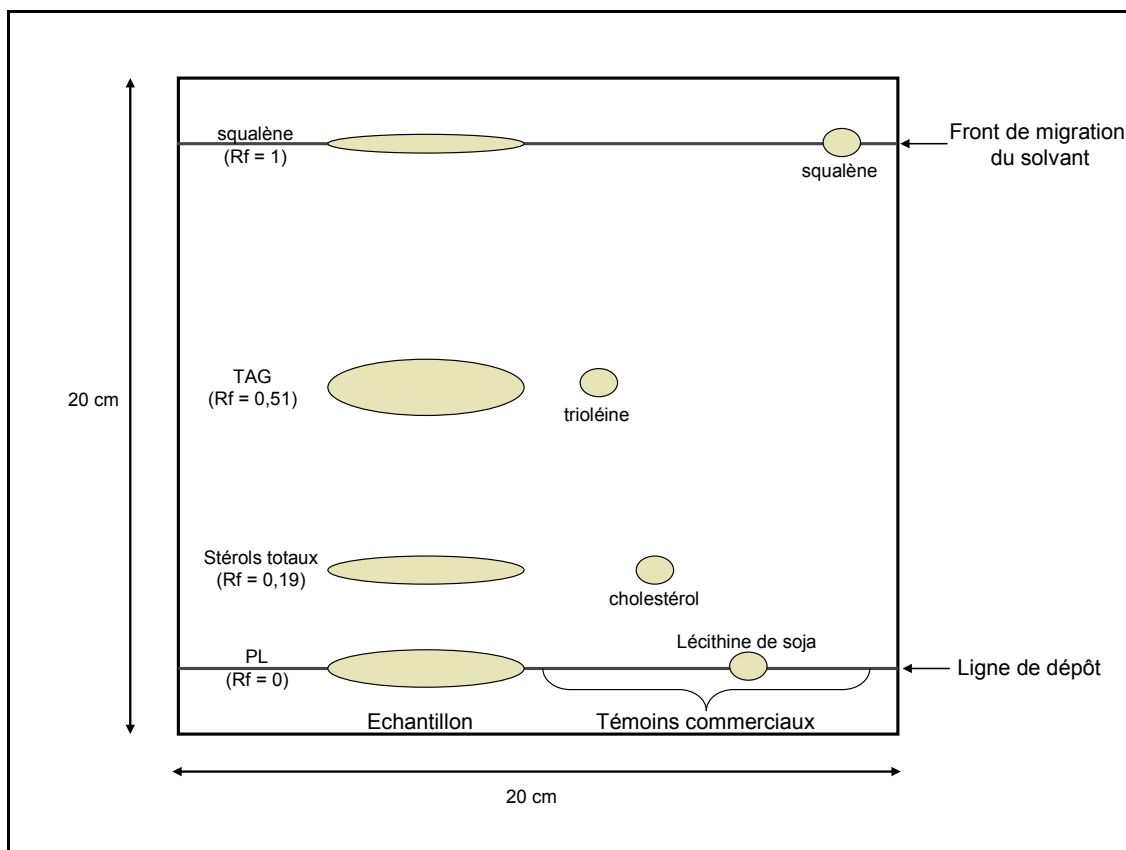
Après filtration sur de la laine de verre lavée au dichlorométhane/méthanol, l'extrait est évaporé sous azote à l'évaporateur rotatif sous vide à 45°C. Cette procédure d'extraction à chaud est répétée trois fois.

Une fois le mélange d'extraction évaporé, les lipides totaux obtenus sont élués dans 1 ml du mélange d'extraction, afin que les lipides ne s'oxydent pas à l'air. La radioactivité contenue dans 5 µl de ce mélange contenant les lipides totaux a été quantifiée au compteur à scintillation liquide après ajout de 10 ml de liquide de scintillation pour solution organique (Rotiszint Eco ready-to-use, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Allemagne). L'extrait lipidique total est ensuite concentré sous un flux continu d'azote.

- Séparation des principales classes lipidiques

Les quatre principales classes lipidiques (PL, TAG, stérols et squalène) ont été séparées sur gel de silice par chromatographie sur couche mince (CCM) (20x20 cm, type Silicagel 60F<sub>254</sub>, Merck) en utilisant un mélange hexane/diéthylether/acide acétique glacial (78/20/4, v/v/v, Weete et al., 1985) comme solvant de migration. Quelques gouttes d'un mélange de dichlorométhane/méthanol (2/1) et de HTB ont été ajoutées dans les piluliers pour solubiliser les échantillons lipidiques et après agitation, ce mélange a été appliqué sur la plaque de silice. Des solutions commerciales de trioléine, cholestérol, lanostérol, lécithine de soja (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) et squalène (Acros Organics, Geel, Belgique) ont été utilisées comme témoins. Après la migration d'environ 1h, une solution de primuline à 0,01% (p/v) dans l'acétone aqueuse (80%) a été pulvérisée pour localiser sous une lampe UV (254 nm) les classes lipidiques séparées sur la plaque de silice. La radioactivité associée aux

différentes classes de lipides après la CCM a été détectée par un lecteur de plaque (AR 2000, Bioscan, Washington, USA). Les bandes identifiées correspondantes aux PL totaux, aux stérols totaux (4-déméthylstérols et leurs précurseurs : 4,4-diméthylstérols, 4 $\alpha$ -méthylsterols, non séparés dans ce système de solvants), les TAG et le squalène ont migré à des valeurs de « référence front » ou rapport frontal (Rf) sont de 0 pour les PL; 0,19 pour les stérols totaux; 0,52 pour les TAG et 1 pour le squalène (Figure 31).



**Figure 31:** Schéma représentatif de la séparation des lipides totaux sur la plaque de silice (type Silicagel 60F<sub>254</sub>) après CCM avec le mélange de solvants de migration hexane/diéthylether/acide acétique glacial (78/20/4, v/v/v).

La silice des taches correspondant aux quatre classes de lipides séparées est grattée. Les différents lipides sont élués dans du dichlorométhane, excepté pour les PL totaux, qui ont été élués dans une solution de dichlorométhane/méthanol/acide acétique glacial (25/25/1,25; v/v/v).

Après filtration sous vide pour éliminer la silice, les quatre classes lipidiques ont été concentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide dans un bain-marie à 45°C.

Après ajout de 1 ml de dichlorométhane dans l'erenmeyer contenant les TAG, 25  $\mu$ l de ce mélange ont été prélevés et mélangés à 10 ml de liquide de scintillation pour solution

organique dans une fiole. La radioactivité contenue dans les TAG a été quantifiée par un compteur à scintillation liquide.

De même, après ajout de 1 ml du mélange de solvants utilisés pour éluer les PL totaux, 50 µl de cette solution contenant les PL ont été mélangés à 10 ml de liquide de scintillation pour solution organique dans une fiole. La radioactivité contenue dans les PL totaux a été quantifiée par un compteur à scintillation liquide.

Les PL totaux ont ensuite été séparés par CCM en utilisant le mélange chloroforme/acétone/méthanol/acide acétique glacial/H<sub>2</sub>O (10/4/2/2/1; v/v/v/v) comme solvant de migration. Les plaques ont été préalablement activées dans un four à 110°C. Des solutions commerciales d'acide phosphatidique (AP), de PC, de PE, de PG et de lécithine de soja (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) ont été utilisées comme témoins. Une fois la migration terminée, la plaque a été déposée dans une cuve contenant de l'iode bisublimé pour révéler les composés sur la plaque (Figure 32, photo a). Ce réactif se fixe sur les doubles liaisons des chaînes acyles des lipides.

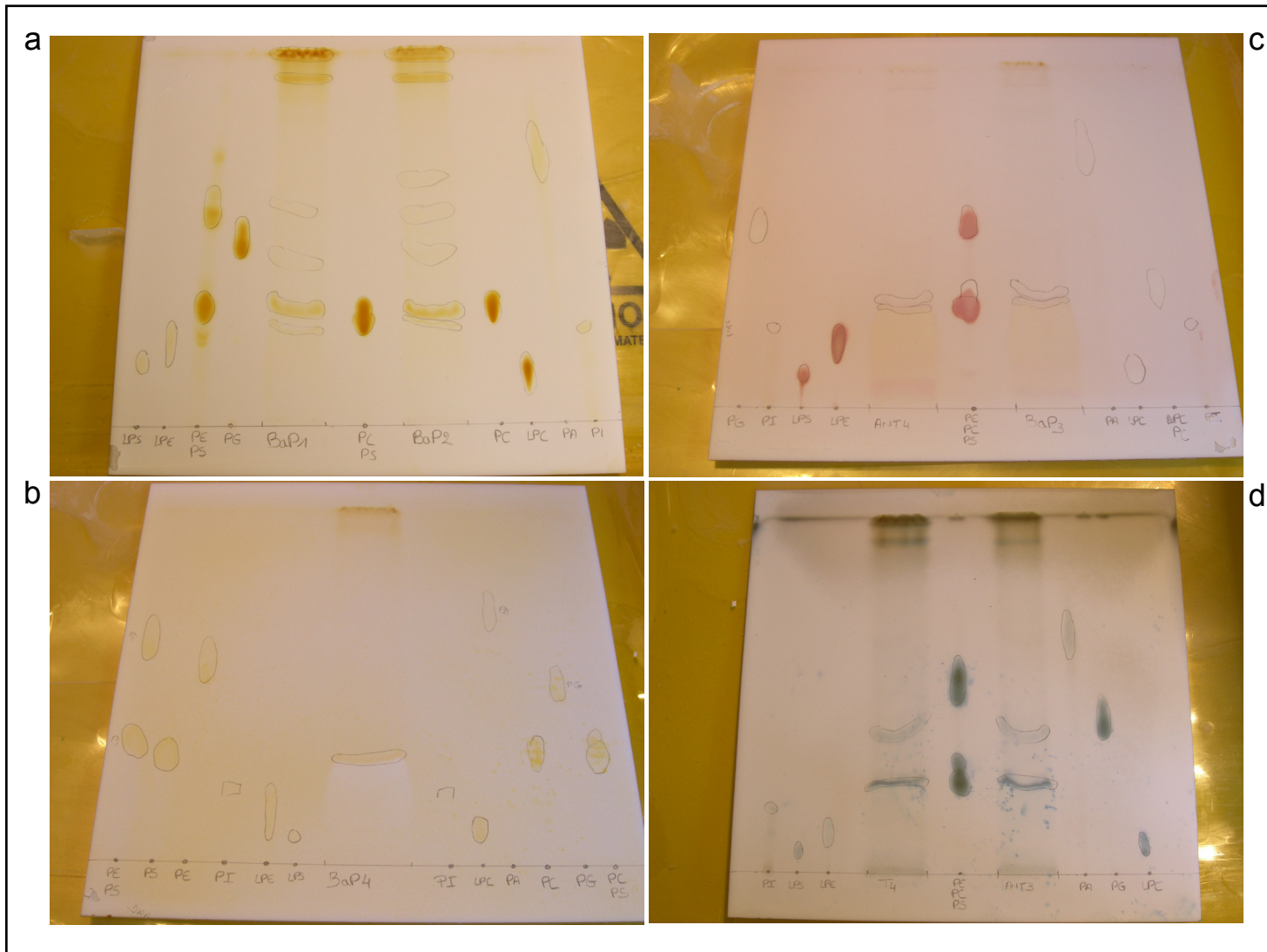
Différents colorants ont également été pulvérisés sur les plaques pour révéler les PL. Les échantillons ont été appliqués sur des plaques différentes (Figure 32) puisqu'il était possible de pulvériser un seul colorant par plaque:

- La Ninhydrine, (0,2 g dans 100 ml d'isobutanol contenant 0,5 ml d'acide acétique) qui révèle la PE et la PS en colorant la tâche correspondante en rouge/violet (Wagner et al., 1961) (Figure 32, photo b).
- Le réactif de Dragendorff, qui révèle la PC en colorant la tâche correspondante en jaune (Figure 32, photo c).
- L'ammonium molybdate [0,5 g dans une solution de 9 ml de H<sub>2</sub>O/acide chlorhydrique (à 25%)/acide perchlorique (à 70%) (5/1,5/2,5; v/v/v) puis l'acétone est ajouté au mélange jusqu'à qsp 50 ml de solution)], qui révèle les phospholipides en les colorant en bleu (Hanes et Isherwood, 1949; Dittmer et Lester, 1964) (Figure 32, photo d).

Les plaques ainsi pulvérisées avec les colorants ont été placées dans le four pendant 10 min et les composés qui se sont colorés ont été identifiés .

La radioactivité contenue dans chaque PL, après CCM, a été quantifiée grâce au lecteur de plaque.





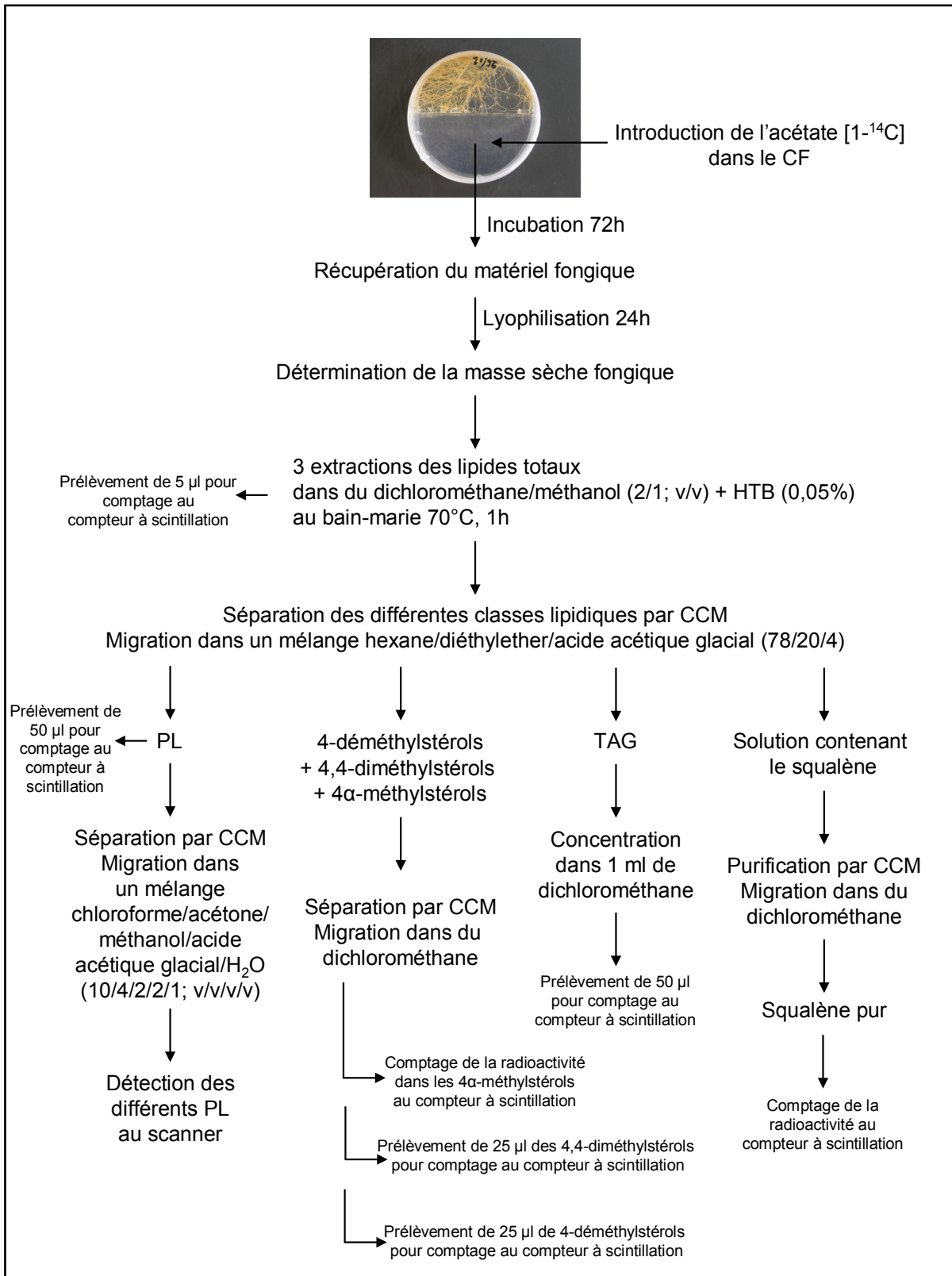
**Figure 32:** Phospholipides déposés sur les plaques de silice révélés grâce à l'iode bisublimé (photo a), la ninhydrine (photo b), le réactif de Dragendorff (photo c) et l'ammonium molybdate (photo d). Les bandes colorées les plus larges correspondent aux échantillons tandis que les autres taches correspondent aux témoins commerciaux.

Les stérols totaux (4-déméthylstérols et leurs précurseurs: 4,4-diméthylstérols et 4 $\alpha$ -méthylstérols) ont également été séparés par CCM en utilisant le dichlorométhane comme solvant de migration. Des solutions commerciales de lanostérol et cholestérol (non acétylés) ont été utilisés comme témoins. Deux migrations successives ont été réalisées pour améliorer la séparation de différents composés stéroliques (4-déméthylstérols, 4,4-diméthylstérols et 4 $\alpha$ -méthylstérols). Les composés stéroliques (4-déméthylstérols et les 4,4-diméthylstérols) ont été visualisés sur la plaque après pulvérisation d'une solution de primuline à 0,01% (p/v) dans l'acétone aqueuse (80%) sous une lampe UV (254 nm). Les 4 $\alpha$ -méthylstérols n'étant pas visibles sous UV ont été révélés grâce la radioactivité associée à ces composés par le lecteur de plaque Bioscan. Les composés ainsi identifiées correspondant aux 4-déméthylstérols, 4 $\alpha$ -méthylsterols et 4,4-diméthylstérols ont pour valeurs de Rf de 0,34; 0,47 et 0,56.

La bande de silice correspondant aux 4 $\alpha$ -méthylstérols a été grattée et la silice a été directement ajoutée à 1 ml de dichlorométhane et 10 ml de liquide de scintillation pour solution organique dans une fiole. La radioactivité contenue dans ces précurseurs de stérols a été quantifiée par le compteur à scintillation liquide.

Les bandes de silice correspondant aux 4-déméthylstérols et 4,4-diméthylstérols ont été grattées, éluées dans du dichlorométhane et après filtration sous vide, les échantillons ont été concentrés grâce à un évaporateur rotatif sous vide dans un bain à 45°C. Après élution des composés stéroliques dans 1 ml de dichlorométhane, 25  $\mu$ l du solvant contenant les 4-déméthylstérols ou les 4,4-diméthylstérols ont été ajoutés à 10 ml de liquide de scintillation pour solution organique dans une fiole. La radioactivité contenue dans les composés stéroliques a été quantifiée par un compteur à scintillation liquide.

Enfin, le squalène a été purifié par CCM, en utilisant le dichlorométhane comme solvant de migration. Une solution commerciale de squalène a été utilisée comme témoin. Une fois la migration terminée, une solution de primuline à 0,01% (p/v) dans l'acétone aqueuse (80%) a été pulvérisée pour localiser sous UV (254 nm) le squalène ayant migré sur la plaque de silice à une valeur de Rf de 1. La bande de silice correspondant au squalène a été grattée et mise directement dans une fiole avec 1 ml de dichlorométhane pour l'éluer. 10 ml de liquide de scintillation pour solution organique ont été ajoutés et la radioactivité associée au squalène a été quantifiée par un compteur à scintillation liquide.



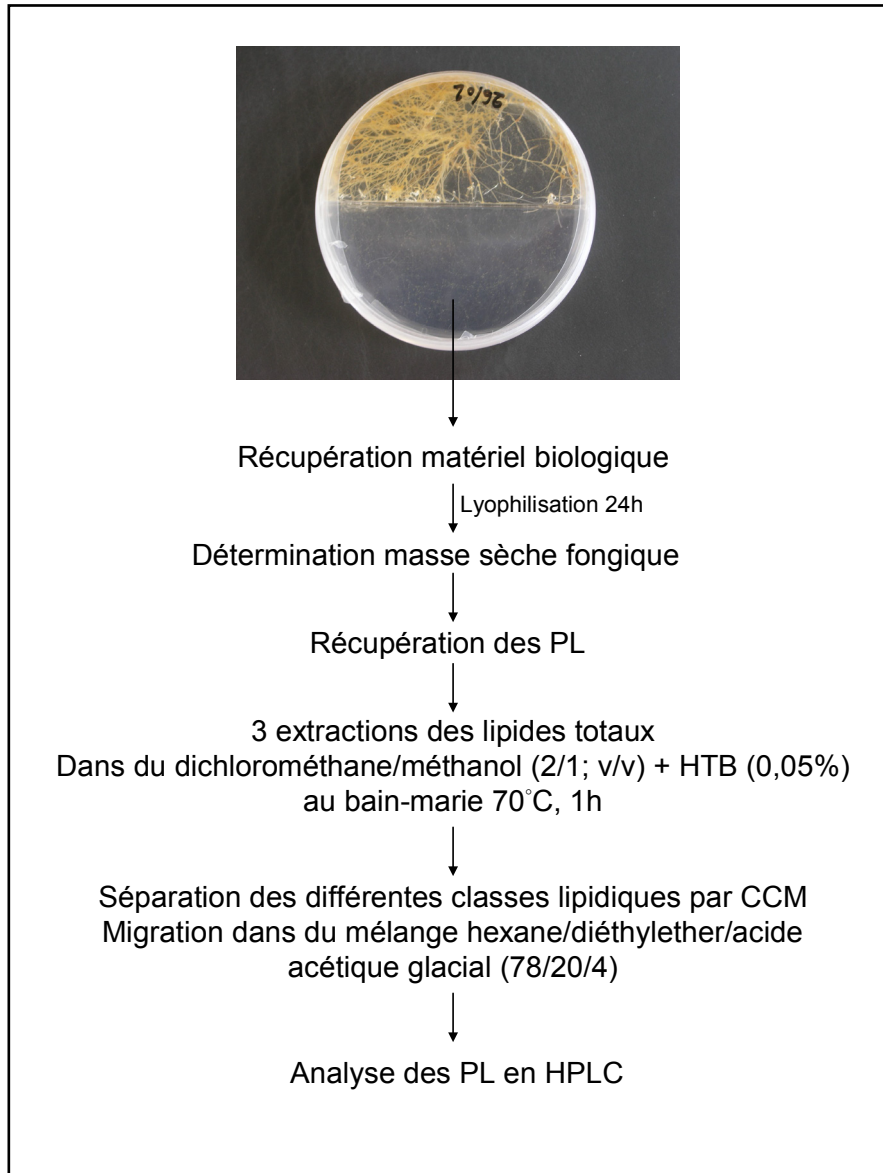
**Figure 33:** Schéma récapitulatif de la méthodologie employée lors de l'expérience de marquage et d'extraction des différentes classes lipidiques fongiques.

## II.5.2. Extraction et analyse des PL et des TAG

- Extraction des PL fongiques

Chaque tâche correspondant à chaque PL radiomarké précédemment identifié sur la plaque de silice a été grattée et éluée dans le mélange dichlorométhane/méthanol/acide acétique glacial (25/25/1,25; v/v/v). Après filtration sous vide et concentration grâce à l'évaporateur rotatif sous vide dans un bain à 45°C, chaque PL a été repris dans du chloroforme pour être quantifié en HPLC. Malheureusement, les résultats n'ont pas été concluants.

Une seconde extraction sur un matériel non radioactif a donc été réalisée en utilisant la même méthode que précédemment pour les lipides radiomarkés. Après 3 extractions à chaud au bain marie à 70°C et sous reflux, des lipides totaux sont séparés par CCM. La bande correspondant aux PL a été grattée et éluée dans le mélange dichlorométhane/méthanol/acide acétique glacial (25/25/1,25; v/v/v). Après filtration sous vide afin d'éliminer la silice, les PL totaux ont été concentrés grâce à l'évaporateur rotatif sous vide dans un bain à 45°C. Enfin, les PL totaux ont été repris dans 100 µl de chloroforme. 20 µl ont été injectés en chromatographie liquide haute pression (HPLC). Les principales étapes de l'extraction des PL sont résumées dans la Figure 34.

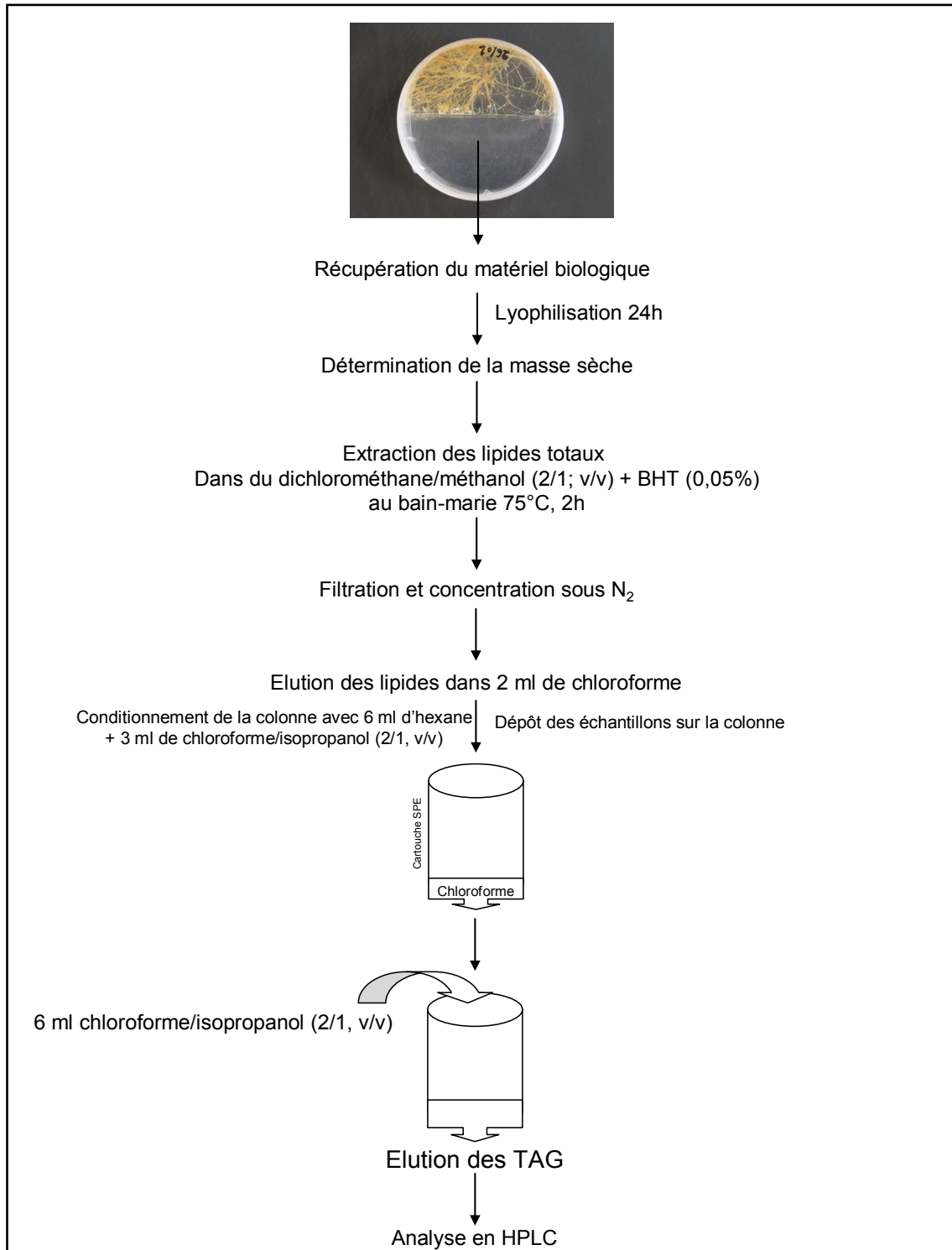


**Figure 34:** Schéma récapitulatif de la méthodologie employée lors de l'extraction et de l'analyse des PL fongiques.

#### ▪ Extraction des TAG fongiques et racinaires

20 ml du mélange dichlorométhane/méthanol (2:1, v/v) avec 0.05% de HTB, ont été ajoutés à la matière sèche fongique ou racinaire. Après agitation, l'extraction des lipides a été réalisée à chaud, dans un bain-marie à 75°C pendant 2h. Après filtration et concentration sous N<sub>2</sub>, les échantillons ont été repris dans 2 ml de chloroforme pour être appliqués sur des cartouches de Solid Phase Extraction (SPE) après leur conditionnement avec 6 ml d'hexane et 3 ml de chloroforme/isopropanol (2:1, v/v). Des colonnes de gel de silice (GracePure 3 mL volume, 500 mg sorbents, Grace Davidson Discovery Sciences, Alltech, Deerfield, USA) ont été utilisées. Les TAG ont été élués avec 6 ml du précédent mélange

(chloroforme/isopropanol; 2/1; v/v) dans des tubes à essai. Après avoir concentré les TAG dans un évaporateur rotatif sous vide dans un bain à 45°C, les TAG, ceux-ci ont été repris dans 1 ml de chloroforme. 5 µl ont été prélevés pour être injectés en HPLC. Les principales étapes de l'extraction des TAG sont schématisées dans la Figure 35.



**Figure 35:** Schéma récapitulatif de la méthodologie employée lors de l'extraction et de l'analyse des TAG fongiques ou racinaires par colonne SPE.

▪ Analyse en HPLC des PL et des TAG.

L'analyse des PL et des TAG a été réalisée grâce à l'utilisation d'une HPLC 600 Controller (Meadows Instrumentation Inc, Bristol, Royaume-Uni) équipée d'un injecteur automatique et d'un détecteur Alltech (Deerfield, USA) 3300 ELSD (Evaporative Light Scattering Detector). Une colonne de silice analytique (150 mm x 3.0 mm, I.D. 3 µm) (Alltech, Deerfield, USA) a été utilisée. La séparation chromatographique a été menée en utilisant un gradient tertiaire linéaire de 54 min pour chaque échantillon avec pour éluents:

Eluent A: 2,2,4-triméthylpentane/méthyl-tert-butyl-éther (98/2; v/v),

Eluent B: Isopropanol/chloroforme/acétonitrile/acide acétique (84/8/8/0,025; v/v/v/v),

Eluent C: Isopropanol/H<sub>2</sub>O/triéthylamine (50/50/0,2; v/v/v).

La séparation des PL et des TAG a été réalisée selon le schéma suivant:

Temps (min)	% du solvant A	% du solvant B	% du solvant C	Débit de solvant (ml/min)
0	100			1
5	80	20		1
15	44	52	4	1
40	34	52	14	1,4
41	30	70		1,4
46	100			1,8
54	100			2

La nébulisation a été réalisée sous un flux de N<sub>2</sub> maintenu à 1,5 ml/min et à la température de 40°C.

La détermination des PL, de l'AP et des TAG a été réalisée par comparaison de leur temps de rétention dans la colonne HPLC par rapport à des standards commerciaux (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

Lipides	abréviation	Temps de rétention (min)
Triacylglycérol	TAG	3
Phosphatidylglycérol	PG	27
Phosphatidyléthanolamine	PE	28
Phosphatidylsérine	PS	37
Phosphatidylcholine	PC	38
Acide phosphatidique	AP	29

**Tableau 10:** Temps de rétention des standards PL, AP et TAG utilisés pour la détermination.

### II.5.3. Activités enzymatiques et dosages protéiques

Les principales étapes concernant l'extraction du contenu enzymatique du matériel biologique, la mesure des activités enzymatiques et le dosage des protéines sont schématisés dans la Figure 36.

- Extraction du contenu protéique des racines et du CMA

Le matériel biologique (racines (environ 100 mg) ou CMA (entre 19 et 49 mg)) récolté a été broyé dans un mortier grâce à de l'azote liquide. Un ml de tampon d'extraction STEB (sucrose-triton extraction buffer, Trizma Base 20 mM, pH 8) (Sen et Hepper, 1986) a été ajouté à l'échantillon broyé dans le mortier. L'échantillon a été broyé à nouveau dans le tampon d'extraction jusqu'à ce qu'il ait une consistance homogène et liquide. Le tampon d'extraction est composé de:

- 20 mM de Trizma base
- 10 mM de NaHCO<sub>3</sub>
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA (2H<sub>2</sub>O),
- 10 mM β-mercaptoethanol,
- 10% saccharose
- 0.1% Triton X-100

Le broyat a été récupéré et centrifugé à 16000 rpm pendant 20 min à 4°C et le surnageant a été récupéré et stocké à -80°C avant le dosage des lipases, des phosphatases et la détermination de la concentration protéique.

- Dosage des lipases

Le dosage des lipases (EC 3.1.1.3.) est basé sur la méthode spectrophotométrique décrite par Pinsirodom et Parkin (2001) avec quelques modifications inhérentes à notre matériel biologique, le CMA *Rhizophagus irregularis*.

Pour chaque échantillon, 150 µl du surnageant précédemment obtenu ont été mélangés à 500 µl de tampon Tris-HCl (100 mM, pH 8,2) et 500 µl du substrat de la réaction, le *p*-nitrophenyl palmitate (420 µM). Pour préparer cette dernière solution, 15,8 mg de *p*-nitrophenyl palmitate, 17 mg de sodium dodecyl sulfate (SDS) et 1 g de triton X-100 ont été dissouts dans 100 ml d'eau ultra-pure. La solution a été chauffée à 65°C pendant 15 min



(jusqu'à dissolution totale du SDS) et mise à refroidir à température ambiante avant utilisation.

Après agitation, le mélange contenant l'échantillon a été incubé au bain-marie pendant 60 min à 37°C à l'obscurité. Différents temps d'incubation ont été testés (15, 30 et 60 min) et l'activité était détectable à 60 min.

Pour chaque échantillon, un témoin est réalisé. Il est constitué de 150 µl échantillon mélangé avec 1 ml de tampon Tris-HCl (100 mM, pH 8,2) sans le substrat de la réaction enzymatique, le *p*-nitrophényl palmitate.

L'activité enzymatique des lipases a été déterminée grâce au dosage du *p*-nitrophénol libéré après hydrolyse du *p*-nitrophényl palmitate. Le *p*-nitrophénol est quantifié grâce à une courbe étalon réalisée avec une gamme de concentration de *p*-nitrophénol allant de 0,001 à 0,05 mM dans le tampon Tris-HCl (100 mM, pH 8,2). La lecture se fait grâce à un spectrophotomètre (Jenway 6405 UV/vis., Felsted, UK) à 410 nm.

L'activité lipasique a été calculée comme suit:

$$\text{Activité lipasique (U/}\mu\text{l)} = [\text{échantillon}] \times a / 60$$

avec:  $[\text{échantillon}]$  (mmol/l) = la concentration de *p*-nitrophénol libérée après hydrolyse du *p*-nitrophényl palmitate par les lipases.

$a$  = facteur de dilution

60 = temps de réaction (min)

L'activité des lipases a ensuite été rapportée à la concentration de protéine et exprimée en U/mg de protéine.

- Dosage des phosphatases alcalines et acides.

Pour chaque échantillon, 160 µl du surnageant prélevé ont été ajouté à 800 µl de tampon carbonate (0,1 M, pH 8,8) pour le dosage des activités phosphatases alcalines ou de tampon acétate de sodium (0,1 M, pH 5,5) pour le dosage des phosphatases acides, contenant tous les deux le substrat de la réaction, le *p*-nitrophénylphosphate (6,7 mM) (Wako LabAssay™ ALP, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan).

Le tampon carbonate a été préparé selon Delory et King (1945) par le mélange d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,1 M) et d'une solution de NaHCO<sub>3</sub> (0,1 M) (1/9; v/v). Après avoir vérifié que le pH de ce mélange était à 8,8, du MgCl<sub>2</sub> (0,002 M) a été ajouté à la solution.

Le tampon sodium acétate (0,1 M) a été préparé selon Green (1933) avec l'acétate de sodium trihydraté et le pH a été ajusté à 5,5 avec de l'acide acétique glacial.

Après agitation, les échantillons mélangés avec le tampon carbonate ou acétate de sodium avec le *p*-nitrophénylphosphate ont été incubés au bain-marie pendant 15 min à 37°C à l'obscurité. Une fois l'incubation terminée, la réaction enzymatique a été stoppée par l'ajout de 640 µl de NaOH (0,2 M).

Le témoin de cette réaction est composé de 160 µl échantillon mélangé à 800 µl de tampon carbonate (ou acétate de sodium sans le substrat de la réaction, *p*-nitrophénylphosphate).

L'activité enzymatique des phosphatases a été déterminée grâce au dosage du *p*-nitrophénol libéré après hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate. Le *p*-nitrophénol est quantifié grâce à une courbe étalon réalisée avec une gamme de concentration de *p*-nitrophénol allant de 0,125 à 1 mM dans le tampon carbonate (0,1 M, pH 8,8) ou acétate de sodium (0,1 M, pH 5,5). La lecture a été réalisée avec un spectrophotomètre à 405 nm.

L'activité phosphatase a été calculée comme suit:

$$\text{Activité phosphatase (U/}\mu\text{l)} = [\text{échantillon}] \times a / 15$$

avec: [échantillon] (mmol/l) = la concentration de *p*-nitrophénol libérée après hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate par les phosphatases.

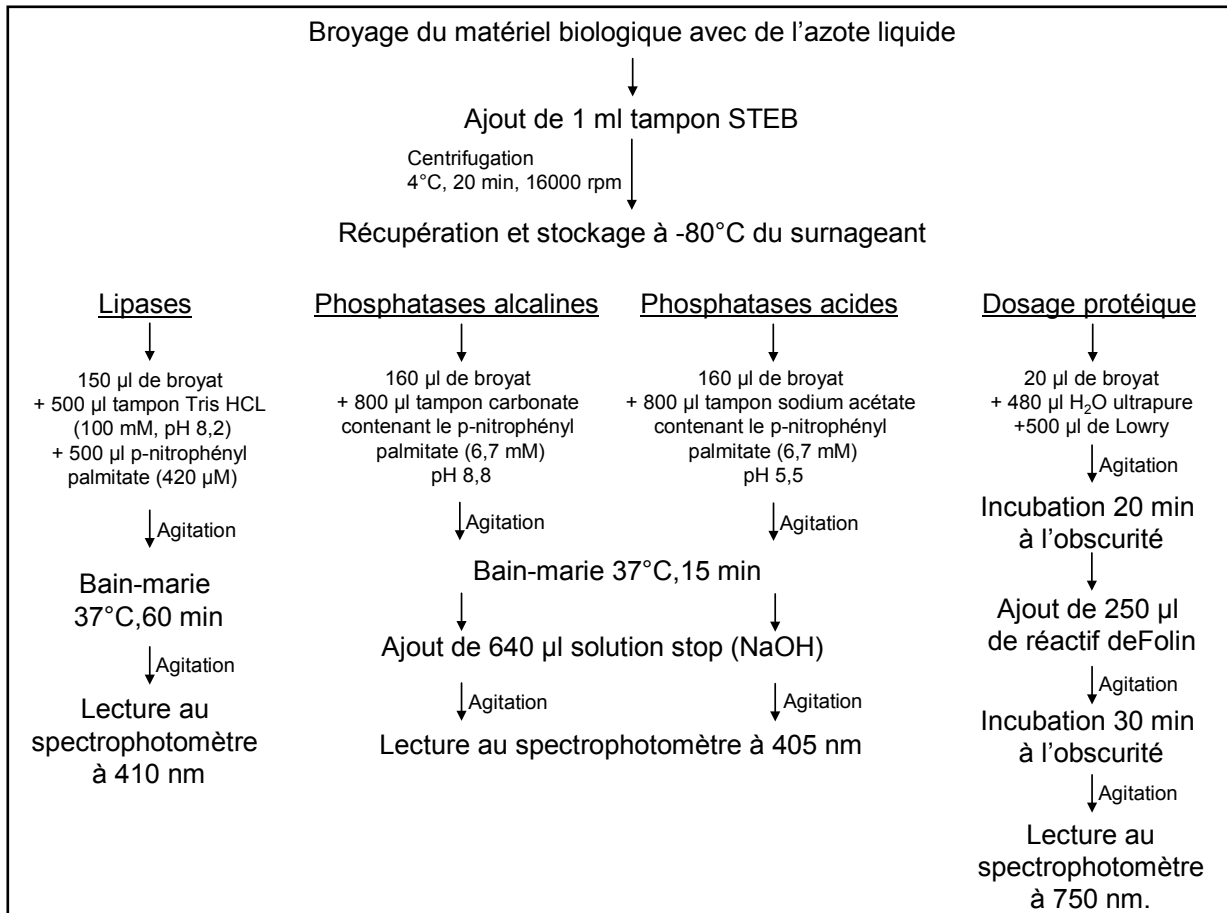
a = facteur de dilution

15 = temps de réaction (min)

L'activité des phosphatases alcalines ou acides a ensuite été rapportée à la concentration de protéine et exprimée en U/mg de protéine.

#### ▪ Dosage des protéines

Les concentrations en protéines totales dans les extraits racinaires et fongiques ont été déterminées grâce à l'utilisation du kit "Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification" (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), selon les instructions du fabricant.



**Figure 36:** Schéma récapitulatif de la méthodologie employée pour l'extraction et l'analyse du contenu enzymatique et protéique du matériel biologique.

## II.6. Transport du P du mycélium extra-racinaire de *Rhizophagus irregularis* vers les racines de chicorée

Une partie des cultures en boîtes bi-compartmentées ont été utilisées pour déterminer la quantité de P transportée par le mycélium extra-racinaire du CMA vers les racines de chicorée. La méthode décrite par Zocco et al. (2011) a été utilisée. Après 9 semaines de culture des racines mycorhizées, une source de  $^{33}\text{P}$  a été ajoutée dans le CF. La source de  $^{33}\text{P}$  était constituée d'orthophosphate dilué dans de l'acide hydrochlorique (<0,1 M) comme recommandé par PerkinElmer (Zaventem, Belgium). La source de  $^{33}\text{P}$  a été stérilisée par filtration (Acrodisc Syringe filters, PALL corporation, Ann Arbor, MI, USA). 200 µl de cette source ont été directement appliqués sur la surface du milieu M dans le CF de chaque boîte. L'activité par boîte au départ de l'expérience était de 1666,7 Bq/ml de milieu M.

Afin de déterminer si la translocation du  $^{33}\text{P}$  du CF au CR était le résultat de processus actifs, des boîtes témoin où l'inactivation du CMA a été réalisée par l'ajout de formaldéhyde

(2%, v/v), à la surface du CF de 5 boîtes, 2 jours avant l'addition du  $^{33}\text{P}$  (Dupré de Boulois et al., 2005) ont été réalisées.

Après 72h d'incubation en présence du  $^{33}\text{P}$ , les racines ont été prélevées du milieu M et les milieux racinaires et fongiques (contenant le CMA) ont été récupérés.

Le transport du  $^{33}\text{P}$  a été mesuré en comptant l'activité dans le milieu M (sur un morceau de gélose correspondant à environ 2 ml, solubilisé dans du tampon citrate (10 mM, pH 6 (Doner et Bécard, 1991) du CR et du CF et dans les racines de chicorée. Les échantillons racinaires ont d'abord été digérés dans une solution de 70% d'acide perchlorique/30% d'acide nitrique (1/1, v/v) comme décrit par Becker et al. (1992). Un aliquot de 10 ml de liquide de scintillation a été ajouté aux échantillons (Ultima GoldTM, Packard BioScience, Groningen, Pays-Bas). L'activité du  $^{33}\text{P}$  dans les échantillons a ensuite été compté grâce un compteur à scintillation Packard TR2500 (Packard Instruments, Meriden, CT, USA).

## II.7. Analyse quantitative de l'expression de gènes impliqués dans le transport du P chez *Rhizophagus irregularis*

### II.7.1. Extraction de l'ARN fongique

L'extraction d'ARN a été réalisée à partir d'environ 100 mg de poids frais du CMA *Rhizophagus irregularis* préalablement conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pour chaque traitement, 3 réplicats ont été extraits et la manipulation a été répétée 3 fois dans le temps pour le B[a]P et 2 fois pour l'anthracène et le mélange des deux HAPs. Le matériel biologique a été broyé dans de l'azote liquide dans des mortiers, préalablement traités au diéthyl pyrocarbonate (DEPC) 0,1% (afin de rendre inactives les RNases) et autoclavés. Les ARN ont été extraits en utilisant le kit "RNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Germany), selon les instructions du fabricant, incluant un traitement avec une enzyme désoxyribonucléase I afin d'éliminer tout ADN génomique résiduel. L'ARN ainsi purifié a été élué dans 50  $\mu\text{L}$  d'eau sans RNases.

Le dosage des ARN a été réalisé par spectrophotométrie avec une dilution au  $1/14^{\text{ème}}$  dans de l'eau DEPC et où une unité de DO à 260 nm correspond à 40  $\mu\text{g/ml}$ . La pureté des acides nucléiques a été vérifiée grâce aux rapports de polysaccharides (DO à 260/230) et de protéines (DO à 260/280). Le degré de pureté des ARN est considéré comme bon si ces rapports sont proches de 2.

La qualité de l'ARN et l'absence de contamination d'ADN a été visualisée sur gel d'agarose 1% dans le tampon Tris/Borate/EDTA (TBE) 0,5x obtenu après dilution de TBE 5x (54 g de Trizma Base + 27,8 g d'acide borique + 4,65 g de Na<sub>2</sub>EDTA dans 1 l d'H<sub>2</sub>O DEPC). Un µg d'ARN précédemment extrait mélangé à 4 µl de Loading Dye Blue/Orange 6x (Promega, USA), constituant le tampon de charge, et 24 µl d'H<sub>2</sub>O DEPC, ainsi que le marqueur de 100 pb (Benchtop 100 pb DNA Ladder (Promega, USA)) ont été déposés dans les puits. La migration s'est faite à 70 V pendant 2h grâce au générateur Biorad Power PAC 1000. Après migration, le gel d'ARN a été déposé dans le bromure d'éthidium (BET) (40 µl dans 300 ml d'H<sub>2</sub>O DEPC) pendant 20 min puis dans de l'H<sub>2</sub>O DEPC pendant 15 min pour être visualisé sous UV. Le BET est un agent intercalant, marqueur d'acide nucléique qui devient fluorescent lorsqu'il est exposé à des rayonnements UV.

Les ARN ainsi obtenus ont été conservés à -80°C.

### II.7.2. Transcription inverse

Les ADNc correspondants aux ARN isolés ont ensuite été synthétisés grâce au kit "High Capacity cDNA Reverse transcription Kit" (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), selon le protocole fourni par le fabricant. La réaction enzymatique réalisée sur 1 µg d'ARN permettant la synthèse d'ADNc double brin a été induite dans un thermocycleur PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) sur un volume total de 20 µl.

Le programme de transcription inverse préconisé par le fabricant du kit était le suivant:

Etape 1	25°C	10 min
Etape 2	37°C	2 heures
Etape 3	85°C	5 min

### II.7.3. Polymerase Chain Reaction (PCR) traditionnelle

Afin de vérifier si les amorces s'accrochent convenablement sur le brin d'ADNc nouvellement formé et ne forment pas de dimères, une PCR traditionnelle a été réalisée.

Par échantillon, la solution de PCR pour chaque gène utilisé était la suivante:

- 2 µl de tampon de réaction
- 2,4 µl de MgCl<sub>2</sub>
- 2 µl de dNTP
- 1 µl d'amorce sens
- 1 µl d'amorce antisens

8,5 µl d'H<sub>2</sub>O stérile  
0,1 µl de Taq polymérase

A ces 17 µl de solution de PCR ont été ajoutés 3 µl d'ADNc issus de la transcription inverse dilué 50x. Le programme de PCR était le suivant:

Etape 1	95°C	3 min		Dénaturation initiale: déshybridation des ARN/ADNc
Etape 2	95°C 60°C 72°C	50 sec 45 sec 45 sec	} 39 cycles	<u>Phase de dénaturation</u> : déshybridation des ADNc double brin <u>Phase d'hybridation</u> des amorces <u>Phase d'élongation</u> : synthétisation du brin complémentaire de l'ADNc matrice
Etape 3	72°C	10 min		Extension

Les bandes correspondantes aux gènes amplifiés après PCR ont été visualisées sur gel d'agarose 2% dans du TBE 0,5%. 10 µl de produit d'amplification mélangé à 4 µl de loading dye blue/Orange 6x, ainsi que le marqueur PGEM (4 µl) (Promega, USA) ont été déposés dans les puits. Après migration réalisée comme précédemment pour l'ARN, le gel a été déposé dans une cuve contenant le BET pendant 20 min, puis dans une cuve contenant de l'eau pendant 15 min et les bandes correspondantes aux gènes amplifiés ont été visualisées sous UV.

#### II.7.4. PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)

Une qRT-PCR a été réalisée dans des plaques de 96 puits sur un appareil 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), afin de déterminer le niveau de transcription des gènes *GiPT* et *GiALP*.

Chaque gène étudié pour chaque échantillon a été amplifié par qRT-PCR en trois répétitions techniques et chaque réaction individuelle de qRT-PCR a été réalisée dans un volume total de 25 µl contenant:

12,5 µl de Power Syber Green Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), agent intercalant fluorescent une fois lié à l'ADN double brin  
400 nM de chacune des amorces sens et antisens (1 µl),  
5,5 µl d'H<sub>2</sub>O stérile  
25 ng d'ADNc (5 µl) issu de la reverse transcription dilué 10x.

La qRT-PCR a été réalisé suivant le programme suivant:

Etape 1	95°C	10 min		Activation de la polymérase
Etape 2	95°C	50 sec	} 40 cycles	Dénaturation
	60°C	45 sec		Hybridation des amorces
	72°C	45 sec		Elongation du brin complémentaire et lecture de la fluorescence
Etape 3	95°C	15 sec		Courbe de dissociation
	60°C	30 sec		
	95°C	15 sec		

Une courbe de dissociation a été réalisée après chaque migration afin de vérifier l'absence de tout produit PCR non spécifique.

Avant réalisation des expériences de quantification de l'expression des gènes *GiPT* et *GiALP*, des tests d'efficacité ont été réalisés sur chaque couple d'amorce. Une gamme de dilution au 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 et 1/100000 des ADNc obtenu après transcription inverse a été réalisée sur le CMA cultivé en absence des HAPs.

Les amorces utilisées pour la réalisation de la PCR traditionnelle et la qRT-PCR et déterminées grâce au logiciel Primer Express v3.0 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) étaient les suivantes:

Gènes	Amorces sens 5' --> 3'	Amorces antisens 5' --> 3'	Taille de l'amplicon (pb)	Températures d'hybridation
<i>GiPT</i>	CCGTTCTGGTTATTGGGTT ACT	GGCAGCACCCATGACAA TAAA	110	59,3°C
<i>GiALP</i>	TGTCACGAGCCGTATCACT CA	TTCCAAGAGGATAATCGC CAATT	113	59,3°C
<i>Gi18S</i>	GGAACAATTGGAGGGCAA GTC	CAACCTACTAACCCCGAA ATTCAAC	117	59,7°C

## II.8. Dosage et analyse du B[a]P et des métabolites issus de sa dégradation

Pour cette expérience, en plus des boîtes mono-compartmentées contenant des racines de chicorée mycorhizées ou non et des boîtes bi-compartmentées où le CMA se développe seul en présence du B[a]P, des boîtes mono- et bi-compartmentées contenant le milieu de culture avec le B[a]P mais non inoculées avec les racines et le CMA ont été préparées (témoins abiotiques). Ces témoins abiotiques, ainsi que le matériel biologique cultivé en présence du B[a]P ont été incubés pendant 12 semaines à l'obscurité. Les principales étapes

résumant l'extraction du B[a]P à partir du matériel biologique (racines et CMA) et à partir du milieu de culture ainsi que dans les témoins abiotiques sont présentées dans la Figure 37.

### II.8.1. Extraction du B[a]P

Après 12 semaines d'incubation, le milieu contenu dans les boîtes servant de témoin abiotique a été solubilisé avec le tampon Tris-HCl (Trizma-Base 50 mM - EDTA 10 mM, pH 7.5) dans un erlenmeyer. La solution obtenue a été placée dans une ampoule à décanter et l'erlenmeyer a été rincé avec 50 ml de dichlorométhane afin de récupérer un maximum de B[a]P adsorbé. Après décantation, la phase inférieure contenant le B[a]P a été récoltée. Les échantillons ont été concentrés dans l'évaporateur rotatif sous vide dans un bain à 45°C. Les échantillons ont ensuite été récupérés dans une fiole jaugée avec du dichlorométhane et le volume a été ajusté à 25 ml. Un ml de cette solution a été conservé en pilulier pour être analysé en GC.

Pour les boîtes contenant le matériel biologique, le milieu une fois solubilisé a été filtré dans un système de filtration sous vide afin de séparer le matériel biologique du milieu de culture contenant le B[a]P. Le matériel biologique a été rincé avec du dichlorométhane afin d'éliminer le B[a]P qui serait adsorbé et ce dernier a été ajouté au milieu résiduel. Le B[a]P contenu dans ce milieu résiduel a été extrait selon la même procédure décrite précédemment pour les témoins abiotiques.

Le matériel biologique a été lyophilisé pendant 24h. Une fois le poids sec déterminé, le B[a]P contenu dans le matériel biologique a été extrait grâce à un sohxlet (80 ml dichlorométhane durant 12h à 70°C, 1 cycle par heure). Le B[a]P récupéré dans le dichlorométhane a été transféré dans un ballon, puis le solvant a été concentré dans l'évaporateur rotatif sous vide dans un bain à 45°C. Le B[a]P a ensuite été transféré dans une fiole jaugée de 25 ml dans du dichlorométhane. Un ml de cette solution correspondant à la fraction bioaccumulée a été analysé en GC et en GC-MS (Gaz-Chromatography - Mass Spectrometry), afin d'identifier de potentiels métabolites formés lors de la dégradation du B[a]P.



### II.8.2. Analyse en GC

Le B[a]P contenu dans le milieu de culture des témoins abiotiques, le B[a]P résiduel contenu dans le milieu de culture des boîtes inoculées et le B[a]P bioaccumulé dans le matériel biologique ont été analysés par GC équipée d'un injecteur, d'un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) (PerkinElmer, Autosystem, Norwalk, CT, USA) fonctionnant à 280°C et d'une colonne non polaire EC-5<sup>TM</sup> Econo-Cap (Alltech Associates Inc, Deerfield, USA) d'un diamètre de 0,53 µm, d'épaisseur de phase polyéthylène glycol 1,2 µm et de longueur 30 m. Le gaz vecteur est l'hydrogène (10 ml/min); le volume d'injection est de 1 µL. Le programme d'analyse durant 38 min et 45 sec est le suivant :

Température initiale	55°C pendant 1 min
Etape 1	20°C/min jusque 230°C
Etape 2	Plateau pendant 29 min à 230°C

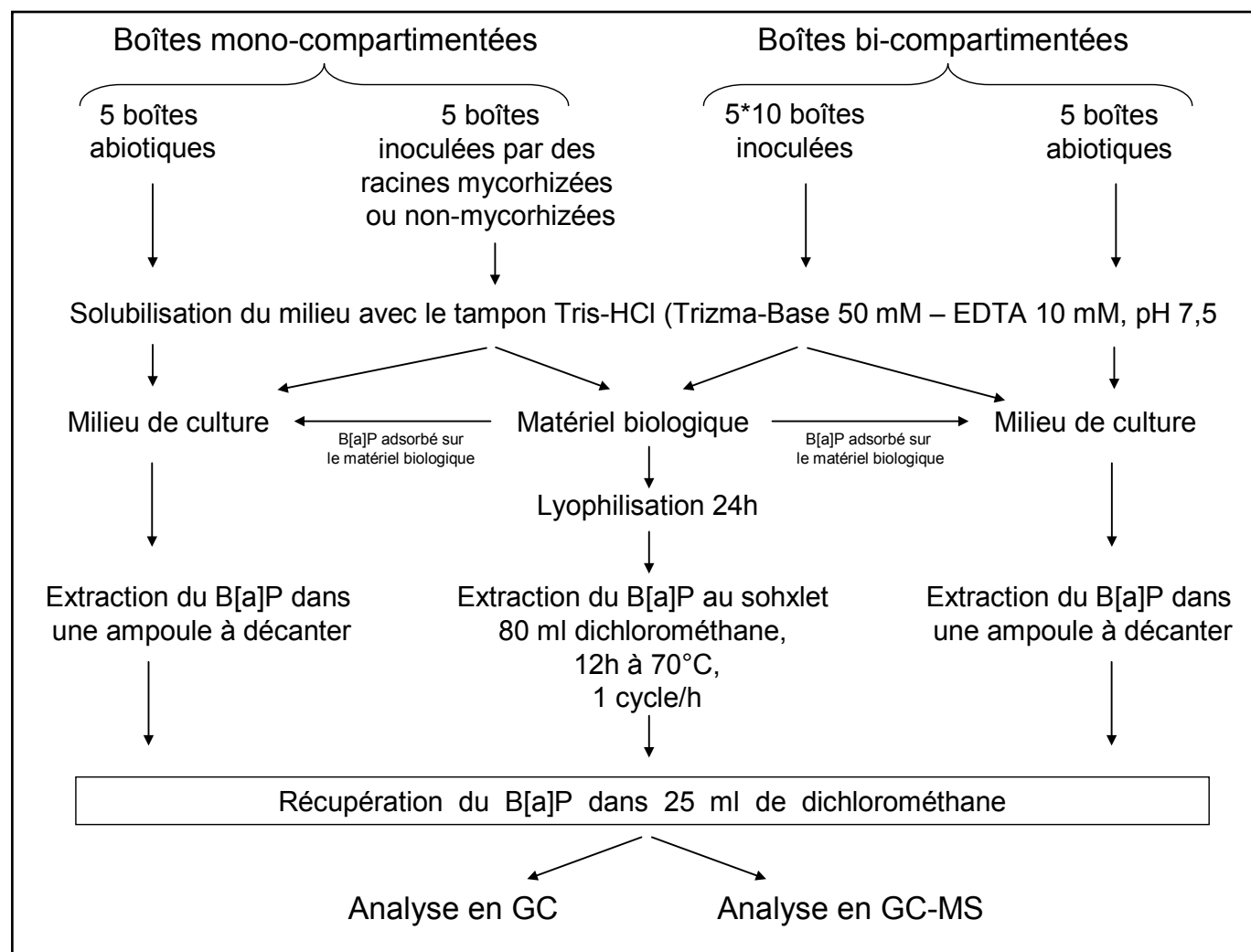
La concentration en B[a]P dans les échantillons a été quantifiée grâce à la réalisation d'une courbe étalon de B[a]P commercial.

### II.8.3. Analyse en GC-MS

L'analyse a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse Varian 3800 (Varian, Walnutcreek, CA, USA) équipé d'un injecteur split-splitless et d'un spectromètre de masse Varian 1200. Les températures de l'injecteur et du détecteur atteignaient 295 et 300°C respectivement. Le gaz vecteur était l'hélium (1 ml/min); le volume d'injection était de 1 µl en mode splitless. L'ionisation électronique (EI) a été utilisée à 70 eV et la gamme de masse scannée était de 50 à 500 m/z.

Le programme d'analyse durant 60 min et 10 sec est le suivant :

Température initiale	70°C pendant 2 min
Etape 1	30°C/min jusque 150°C
Etape 2	5°C/min jusque 200°C
Etape 3	4°C/min jusque 310°C
Etape 4	Plateau pendant 18 min à 310°C



**Figure 37:** Schéma récapitulatif de la méthodologie employée lors des principales étapes d'extraction du B[a]P du matériel biologique (racines et CMA) et du milieu de culture sur lequel il s'est développé ainsi que dans le milieu non inoculé (témoin abiotique).

### III. Analyses statistiques

Le test de l'homogénéité de la variance de Levene a été vérifié avant l'utilisation des tests des comparaisons multiples (ANOVA à 1 facteur). Les différences entre le témoin (sans HAP) et l'anthracène, le B[a]P ou le mélange des deux HAPs ont pu être analysées grâce au test LSD ( $p \leq 0,05$  ou  $0,1$ ). La comparaison entre racines mycorhizées et non-mycorhizées a été réalisée grâce au test de Mann-Whitney avec un risque d'erreur de 5%.

Pour normaliser les données initialement exprimées en pourcentage, celles-ci ont été transformées en coordonnées angulaires (arcsinus de la racine carrée :  $p' = \arcsin \sqrt{p}$ ), afin de pouvoir réaliser le test LSD ( $p \leq 0,05$ ). Les résultats ainsi obtenus ont été analysés statistiquement grâce au logiciel STATGRAPHICS (Manugistic Inc., Rockville, MD, USA).

# Chapitre III

---

## Résultats



# Article 1

The arbuscular mycorrhizal *Rhizophagus irregularis* activates storage lipid biosynthesis to cope with the PAHs oxidative stress

M. Calonne, J. Fontaine, D. Debiane, F. Laruelle,  
A. Grandmougin-Ferjani, A. Lounès-Hadj Saharaoui

*Soumis dans New Phytologist*



# Présentation de l'article 1

---

## Introduction - objectif

En raison de leur caractère ubiquiste, de leur abondance, de leur récalcitrance dans l'environnement [temps de demi-vie estimé entre 2 et 16 ans (Wild et al., 1991a,b)] et de leurs effets nocifs chez l'Homme, 16 HAPs ont été classés par l'US-EPA comme polluants prioritaires à éliminer des sols. En effet, ces molécules sont connues pour leur caractère cancérigène et/ou mutagène avéré chez l'Homme (Mastrangelo et al., 1996; Susarla et al., 2002). De plus, dans l'environnement, il est connu que les HAPs affectent de nombreux organismes vivants comme les bactéries, les daphnies, les collemboles, les vers de terre, les algues et les plantes (Leyval et Binet, 1998; Kummerová et Kmentová, 2004; Eom et al., 2007; Maliszewska-Kordybach et al., 2007) et pourraient ainsi perturber le bon fonctionnement des écosystèmes.

Cependant, peu d'études ont abordé l'impact de ces polluants sur les microorganismes telluriques notamment sur les champignons bénéfiques des plantes que constituent les CMA. Seuls quelques travaux ont montré l'effet négatif de ces polluants sur les principaux stades de développement de ces champignons: la germination des spores (Alarcón et al., 2006; Verdin et al., 2006; Franco-Ramírez et al., 2007), la colonisation racinaire (Leyval et Binet, 1998; Joner et Leyval, 2001; Gaspar et al., 2002; Verdin et al., 2006; Debiane et al., 2008, 2009) et le développement extra-racinaire (élongation hyphale et sporulation) (Verdin et al., 2006; Debiane et al., 2008, 2009, 2011). Cette fongitoxicité a été attribuée à l'induction d'un stress oxydant (mis en évidence par la production accrue d'un biomarqueur de peroxydation lipidique, le MDA) et de dommages sur les lipides membranaires fongiques. En effet, les résultats obtenus par Debiane et al. (2011) à l'UCEIV ont montré des diminutions significatives des quantités totales en stérols (principalement le 24-méthylcholestérol et le 24-éthylcholestérol) et de la teneur en PC, le PL majeur chez *Glomus irregulare* DAOM 197198, suggérant soit une dégradation accrue des PL en présence de l'anthracène et du B[a]P, soit une diminution de leur biosynthèse.

Les quelques connaissances que nous possédons sur cette biosynthèse (décrite dans le chapitre bibliographique, partie III) révèlent tout d'abord un transport de carbone, sous forme d'hexose issu de la photosynthèse, de la plante vers le CMA intra-racinaire. En effet, les



travaux de Pfeffer et al. (1999) ont montré l'obtention d'un marquage par le  $^{13}\text{C}$  du groupement glycérol et des acides gras des molécules de TAG, ce qui est en accord avec la métabolisation des hexoses issus des racines hôtes (*via* la glycolyse) en trioses et en acétyl-coA. Des acides gras à 16 atomes de carbone seraient synthétisés à partir de cet acétyl-coA (*via* l'acétyl-coA carboxylase et l'acide gras synthétase) (Trépanier et al., 2005) puis sont estérifiés aux TAG. Ces TAG nouvellement formés sont ensuite stockés dans les globules lipidiques puis transportés vers le mycélium extra-racinaire (Bago et al., 2002a,b). En effet, le développement du mycélium extra-racinaire semble nécessiter la contribution des TAG pour fournir davantage de squelettes carbonés et d'énergie, nécessaires à la synthèse des PL et à la formation des membranes (Gaspar et al., 2001). Contrairement aux acides gras synthétisés uniquement dans le mycélium intra-racinaire, la synthèse *de novo* des stérols a lieu dans le mycélium extra-racinaire, *via* la voie classique du mévalonate (Fontaine et al., 2001a).

Cependant, même si les connaissances sur le métabolisme intra-racinaire des CMA progressent peu à peu, un nombre limité d'études ont été menées sur le métabolisme lipidique extra-racinaire et aucune ne concerne l'impact des polluants tels que les HAPs sur ce métabolisme. C'est pourquoi, pour comprendre comment les HAPs interfèrent avec le métabolisme lipidique des CMA, l'effet de deux HAPs, l'anthracène et le B[a]P, sur la biosynthèse des lipides dans le mycélium extra-racinaire du CMA *Rhizophagus irregularis* cultivé en conditions monoxéniques (en boîtes bi-compartmentées), a été étudié, et ce, grâce à l'incorporation de l'acétate [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] de sodium dans le milieu de culture du compartiment fongique.

1 **The arbuscular mycorrhizal *Rhizophagus irregularis* activates storage lipid**  
2 **biosynthesis to cope with the PAHs oxidative stress**

3  
4 M. Calonne, J. Fontaine, D. Debiane, F. Laruelle, A. Grandmougin-Ferjani,  
5 A. Lounès-Hadj Sahraoui\*

6  
7 Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille  
8 Université du Littoral Côte d'Opale, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV)  
9 F-62228 Calais, France

10 \* corresponding author. *E-mail*: lounes@univ-littoral.fr. *Tel*: +33 3 21 46 36 58  
11

12

13

14 Total word count for the main body of the text: 5451 words

15 Total word count in the introduction: 974 words

16 Total word count in the materials and methods: 1640 words

17 Total word count in the results and discussion: 2741 words

18 Total word count in the acknowledgements: 96 words

19

20 Number of Figures: 4

21 Number of Tables: 4

22 **Summary**

- 23 • The assisted phytoremediation by Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) could  
24 constitute an ecological and economic method to restore Polycyclic Aromatic  
25 Hydrocarbons (PAHs) polluted soils. Unfortunately, little is known about the PAHs  
26 impact on the beneficial symbiotic AMF.
- 27 • Using radiolabelling experiments, our work aims to understand how anthracene and  
28 benzo[a]pyrene (B[a]P), respectively representative of a low and a high molecular  
29 weight PAHs, act on the AMF lipid metabolism.
- 30 • Our results showed that whereas [1-<sup>14</sup>C]acetate incorporation in the membrane lipids  
31 (total phospholipid and sterols) was reduced, it increased by 69% in the storage lipid,  
32 triacylglycerol (TAG) when the AMF extraradical mycelium was grown on B[a]P  
33 contaminated medium, suggesting an activation of TAG biosynthesis. A good  
34 correlation between lipase activity and TAG content validates the hypothesis by which  
35 TAG could be actively hydrolysed by the AMF in the presence of B[a]P.
- 36 • Taken together, our findings suggested the implication of the AMF TAG metabolism  
37 to cope with B[a]P toxicity through two means: (i) by providing carbon skeletons and  
38 energy necessary for membrane regeneration and/or for B[a]P translocation and  
39 degradation as well as (ii) by activating the phosphatidic acid and hexose metabolisms  
40 which may involve in cellular stress defence.

41

42 **Key words:** arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs),  
43 lipids, extraradical mycelium, [1-<sup>14</sup>C]acetate.

## 44 **1. Introduction**

45

46 The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) that belong to a monophyletic phylum,  
47 Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001) establish mutualistic interactions with the roots of the  
48 most terrestrial plants. AMF improve mineral and water plant nutritions (Smith & Read,  
49 2008) and enhance plant tolerance to biotic (for review see Dalpé, 2005) and abiotic stresses  
50 (for review see Schützendübel & Polle, 2002).

51 Unfortunately, several studies demonstrated that the main steps of the AMF life cycle  
52 are inhibited by some pollutants such as Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). PAHs  
53 originating from anthropogenic activities are frequently found in polluted soils (Sung *et al.*,  
54 2002; Gao *et al.*, 2006, 2008). Owing to their great persistence in soils [half-life estimated to  
55 2 years for naphthalene to over 16 years for coronene (Wild *et al.*, 1991a,b)], their dissipation  
56 is limited. Thus, AMF spore germination was found to be significantly reduced in the  
57 presence of PAHs (Alarcón *et al.*, 2006; Verdin *et al.*, 2006; Franco-Ramírez *et al.*, 2007). It  
58 was also shown that the intraradical development (Leyval & Binet, 1998; Joner & Leyval,  
59 2001; Gaspar *et al.*, 2002; Verdin *et al.*, 2006; Debiane *et al.*, 2008, 2009) and the extraradical  
60 hyphae elongation as well as the number of spores produced by the AMF were drastically  
61 decreased by PAHs (Verdin *et al.*, 2006; Debiane *et al.*, 2008, 2009, 2011).

62 Debiane *et al.* (2011) attributed the PAHs inhibition of the AMF development to an  
63 induction of an oxidative stress and by membrane fungal cell damage. An increased  
64 production of the lipid peroxidation biomarker, malondialdehyde (MDA), was pointed out  
65 when the AMF was grown under PAHs pollution. In addition, both membrane lipid contents  
66 of *Glomus irregulare*, sterols and the major phospholipid (PL) have been found to be  
67 particularly affected by the PAHs. On the other hand, Verdin *et al.* (2006) reported an  
68 increased anthracene dissipation by the roots colonized by *Glomus intraradices*. It was

69 showed that whereas one fraction of the dissipated PAH was biodegraded, the second fraction  
70 was accumulated in the AMF mycelium lipid bodies. Biochemical results confirmed that  
71 lipids constitute up to 46-70% of the spore biomass of *Glomus caledonium* (Beilby & Kidby,  
72 1980a) and in *Glomus* sp. vesicles (Jabaji-Hare *et al.*, 1984).

73         During the symbiosis, the plant supplies carbon to the fungal partner via internal  
74 fungal structures (Cooper & Tinker, 1978; Pfeffer *et al.*, 1999) which is primarily stored in  
75 intraradical hyphae as lipids (Bago *et al.*, 2002a,b). Labelling experiments with acetate have  
76 demonstrated that *de novo* palmitic acid synthesis only occurs in intraradical mycelium but  
77 not in germinating spores or in the extraradical mycelium, which could only elongate or  
78 desaturate palmitic acid (Trépanier *et al.*, 2005). These data suggest that fatty acid (FA)  
79 metabolism may be the reason for the obligate symbiosis between the AMF and their plant  
80 hosts (Trépanier *et al.*, 2005). FA distribution in the AMF, especially in *Glomus* species is  
81 ranged from C14 to C24 with three major compounds: C16:1 $\omega$ 5, C16:0 and C18:1 (Dalpé *et*  
82 *al.*, 2012). FA carboxyl group is mostly esterified, either on the sn-1 and sn-2 positions on the  
83 glycerol to form membrane lipid, PL, or on the three positions on glycerol, leading to the  
84 formation of a triacylglycerol (TAG), which constitutes the major form of lipid storage  
85 (Ohlrogge & Browse, 1995).

86         Among membrane lipids, PL represent less than 2% of total lipids found in all fungal  
87 structures on various *Glomus* species (Gaspar *et al.*, 1994) and between 3 to 11% of total  
88 lipids in *Glomus intraradices* extraradical mycelium (Jabaji-Hare, 1988; Fontaine *et al.*,  
89 2001b). PC is the major PL in the AMF ungerminated spores (Beilby & Kidby, 1980a;  
90 Debiane *et al.*, 2011). Relative high PL synthesis during spore maturation could be explained  
91 by extraradical growth and the new spore development (Fontaine *et al.*, 2001b). It was  
92 suggested that during AMF spore germination, lipid synthesis is largely or entirely confined  
93 to membrane production, and consequently PL synthesis (Bago *et al.*, 1999). Moreover, the

94 elongation of the external mycelium and its PL content (Tunlid & White, 1992) indicated that  
95 the hydrolytic activity of TAG in the mycelium contributes to the provision of carbon  
96 skeletons and energy necessary for PL synthesis and membrane formation (Gaspar *et al.*,  
97 2001).

98 Besides PL, sterols represent the second major lipid constituent of the membranes.  
99 They represent between 1 and 3% of total lipids in *Glomus versiforme* and *Glomus*  
100 *intraradices* (Gaspar *et al.*, 1994; Fontaine *et al.*, 2001). The AMF do not contain ergosterol,  
101 the predominant sterol of most fungi (Weete, 1989), but a mixture of 24-alkylated sterols,  
102 mainly 24-methylcholesterol and 24-ethylcholesterol (Fontaine *et al.*, 2001a; Campagnac *et*  
103 *al.*, 2009; Debiane *et al.*, 2011; Calonne *et al.*, 2012). [1-<sup>14</sup>C]acetate was actively taken up by  
104 the fungus *Glomus intraradices* and was incorporated into sterols, highlighting that *de novo*  
105 synthesis of sterols was carried out by the extraradical fungus at different stages by the  
106 classical mevalonate pathway (Fontaine *et al.*, 2001a).

107 Concerning storage lipids, TAG is the main component found in the AMF (Cooper &  
108 Lösel, 1978; Beilby & Kidby, 1980a; Jabaji-Hare, 1988; Gaspar *et al.*, 1994; Fontaine *et al.*,  
109 2001b) and represent between 80.4 and 95.3% of total lipids in AMF ungerminated spores  
110 (Beilby & Kidby, 1980a; Jabaji-Hare, 1988; Gaspar *et al.*, 1994a,b). TAG is synthesized in  
111 the intraradical mycelium and then transported to the extraradical mycelium to sustain the  
112 external hyphae growth, the formation of new spores and their subsequent germination  
113 (Pfeffer *et al.*, 1999; Bago *et al.*, 2002a,b).

114

115 Even if the knowledge on intraradical AMF lipid metabolism is in the progress, very  
116 few studies reported the pollutant impact on the AMF lipid metabolism. This is why, using  
117 the radiolabelling experiments with acetate, the present work aims to compare the effect of  
118 two PAHs [anthracene and benzo[a]pyrene (B[a]P) respectively a low and a high molecular

119 weight PAHs] on the lipid extraradical biosynthesis in the AMF *Rhizophagus irregularis*  
120 grown in *in vitro* cultures.

121

## 122 **2. Materials and methods**

123

### 124 2.1. Fungal growth conditions

125

126 The inoculum consisted of Ri T-DNA-transformed chicory roots (*Cichorium intybus*  
127 L.) (Fontaine *et al.*, 2004) colonized by the AMF *Rhizophagus irregularis*, DAOM 197198  
128 (Schüßler and Walker, 2010). *Rhizophagus irregularis* cultures were established in bi-  
129 compartmental Petri dishes (9 cm) with a watertight plastic wall separating the root  
130 compartment (RC) from the fungal compartment (FC) (St-Arnaud *et al.*, 1996). RC was filled  
131 with 25 ml M medium (Bécard & Fortin, 1988) [solidified with 0.25% (w/v) gellan gum  
132 (Phytigel, Sigma, St Louis, USA)] without PAHs and a piece of mycorrhizal transformed  
133 chicory roots was added on medium. After 3 weeks, FC was filled with 30 ml of M medium  
134 without vitamins and sucrose (M1 medium) and supplemented or not (control) with  
135 anthracene or B[a]P (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) to obtain a concentration of 280 µM, as  
136 described by Debiane *et al.* (2009). Any roots that grow over the plastic wall in the FC were  
137 excised in order to investigate the treatment effect only on extraradical hyphae development  
138 in FC. The dishes were incubated at 27°C in the dark in an inverted position.

139

### 140 2.2. Lipid labelling experiment

141

142 After 6 weeks of incubation, sodium [1-<sup>14</sup>C]acetate (60 mCi mmol<sup>-1</sup>) was added in the  
143 FC at the rate of 10 µCi by Petri dish (4 Petri dishes by PAH treatment) and the experiment

144 was carried out during 72h. After incubation in presence of [1-<sup>14</sup>C]acetate, *Rhizophagus*  
145 *irregularis* was recovered by filtration on a 53 µm sieve after solubilisation of culture M1  
146 medium. The radioactivity in the medium was quantified to check the [1-<sup>14</sup>C]acetate quantity  
147 incorporated in the extraradical mycelium of *Rhizophagus irregularis*, for each PAH  
148 condition. 1 ml of M1 medium culture solubilised with Tris-HCl (50 mM - EDTA 10 mM pH  
149 7.5) was added to 10 ml scintillation liquid for aqueous solution (Rotiszint Ecoplus ready-to-  
150 use, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) and the radioactivity was detected using a liquid  
151 scintillation analyzer (LSA) (Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Counter, Packard  
152 Bioscience Company, Waltham, USA).

153

### 154 2.3. Labelled lipid analysis.

155

156 After 24h of lyophilisation, *Rhizophagus irregularis* lipids were extracted 3 times in  
157 15 ml dichloromethane/methanol (2/1; v/v) with 0.05% of butylated hydroxytoluene (BHT),  
158 at 70°C during 1h. The radioactivity of total lipids was quantified by addition to 10 ml of  
159 scintillation liquid for organic solution (Rotiszint Eco ready-to-use, Carl Roth GmbH,  
160 Karlsruhe, Germany) in the LSA. The active and uniform uptake of the exogenous [1-  
161 <sup>14</sup>C]acetate by the AMF grown in the presence and in the absence of PAHs was checked.  
162 Total lipids was then separated on silica gel thin-layer chromatography (TLC) plates (60F<sub>254</sub>;  
163 Merck Darstadt, Germany) with hexane/ether/glacial acetic acid (78/20/4; v/v/v) as the  
164 migration solvent (one run). Lipids were revealed under UV at 265 nm, after primulin (0.01%  
165 in 80% aqueous acetone) pulverisation. All lipid classes were identified with commercial  
166 standard of triolein, cholesterol, lanosterol, soya lecithin (Sigma-Aldrich, St louis, USA) and  
167 squalene (Acros Organics, Geel, Belgium) and the radioactivity was detected on a radio-TLC  
168 Imaging Scanner (AR 2000, Bioscan, Washington, USA). Identified bands corresponding to



169 PL, 4-demethylsterols and their precursors (4 $\alpha$ -methylsterols and 4,4-dimethylsterols) (not  
170 separated on the plate), TAG and squalene fractions migrated at R<sub>f</sub> values 0; 0.19; 0.52 and 1  
171 respectively. The different lipid classes were scraped off and eluted in dichloromethane,  
172 except for PL, which were eluted with a solution containing  
173 dichloromethane/methanol/glacial acetic acid (1/1/0.05; v/v/v).

174 After concentration, TAG were eluted in 1 ml of dichloromethane and TAG  
175 radioactivity was quantified in the LSA by addition of 10 ml of scintillation liquid for organic  
176 solution.

177 The 4-demethylsterols/4 $\alpha$ -methylsterols/4,4-dimethylsterols separation was realized  
178 by TLC plates using dichloromethane as the migration solvent (2 runs). 4 $\alpha$ -methylsterols (R<sub>f</sub>:  
179 0.47) fraction was identified, scraped off and the silica containing 4 $\alpha$ -methylsterols was  
180 directly eluted in 1 ml dichloromethane and 10 ml of scintillation liquid for organic solution.  
181 4-demethylsterols and 4,4-dimethylsterols (R<sub>f</sub>: 0.34 and 0.56 respectively) were also  
182 recovered and analyzed in the LSA by addition of 10 ml scintillation liquid for organic  
183 solution, after filtration and elution in 1 ml of dichloromethane.

184 Squalene was purified from others components in the recovered squalene fraction by  
185 TLC plates using dichloromethane as the migration solvent (one run). The squalene fraction  
186 was identified, scraped off and the silica containing squalene was directly eluted in 1 ml  
187 dichloromethane and 10 ml of scintillation liquid for organic solution and analyzed in the  
188 LSA.

189 PL were separated also by TLC plates using chloroform/acetone/methanol/glacial  
190 acetic acid (100/40/20/20/10; v/v/v/v/v). PL were detected on TLC plates by using a linear  
191 radioactivity analyzer and identified with commercial standards and TLC staining solutions as  
192 molybdene blue, ninhydrin and Dragendorff reactive as described by Kates (1972). The plates  
193 were analyzed using the radio-TLC Imaging Scanner (AR 2000, Bioscan, Washington, USA).

194 The experiment was conducted on 4 replicates by treatment.

195

#### 196 2.4. PL and TAG extractions and analyses

197

198 PL from the lyophilized biological samples were recovered as described previously for  
199 the lipid labelling experiment. After elution with a solution containing  
200 dichloromethane/methanol/glacial acetic acid (1/1/0.05; v/v/v), filtration and concentration  
201 under N<sub>2</sub>, recovered PL in 100 µl of chloroform were analyzed in a High Pressure Liquid  
202 Chromatography (HPLC) system. The PL extraction was assayed on 5 replicates.

203 TAG from the lyophilized *Rhizophagus irregularis* samples were extracted in 20 ml of  
204 dichloromethane/methanol (2/1, v/v) at 75°C during 2h. After filtration and concentration  
205 under N<sub>2</sub>, samples were collected in 2 ml of chloroform and applied to Solid Phase Extraction  
206 (SPE) cartridges. A silica gel bonded column (GracePure 3 ml volume, 500 mg sorbents,  
207 Grace Davidson Discovery Sciences, Alltech, Deerfield, USA) was used. After conditioning  
208 with 6 ml of hexane and 3 ml of chloroform/2-propanol (2/1; v/v), samples were added on the  
209 column. TAG were eluted with 6 ml of the previous solvent. After solvent evaporation under  
210 vacuum, TAG were quantified in 1 ml of chloroform by HPLC. The experiment was assayed  
211 on 5 replicates.

212 PL and TAG analyses were carried out using an HPLC Waters 600 Controller  
213 (Meadows Instrumentation Inc., Bristol, UK) equipped with an Alltech (Deerfield, USA)  
214 model 3300 Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) and a silica analytical column  
215 (150 mm x 3.0 mm, I.D. 3 µm) (Alltech, Deerfield, USA). A ternary gradient was generated  
216 during 54 min with eluent A of 2,2,4-trimethylpentane/methyl-tert-butyl-ether (98/2; v/v),  
217 eluent B of isopropanol/chloroform/acetonitrile/acetic acid (84/8/8/0.025; v/v/v/v) and eluent  
218 C of isopropanol/H<sub>2</sub>O/triethylamine (50/50/0.2; v/v/v). The PL and TAG chromatographic

219 separations were carried out according to the following scheme:  $t_0$  min: 100% A at 1 ml min<sup>-1</sup>,  
220  $t_5$  min: 80% A and 20% B at 1 ml min<sup>-1</sup>,  $t_{15}$  min: 44%A, 52%B and 4%C at 1 ml min<sup>-1</sup>,  $t_{40}$   
221 min: 34%A, 52%B and 14%C at 1.4 ml min<sup>-1</sup>,  $t_{41}$  min: 30%A and 70%B at 1.40 ml min<sup>-1</sup>,  $t_{46}$   
222 min: 100%A at 1.80 ml min<sup>-1</sup> and  $t_{54}$  min: 100%A at 2 ml min<sup>-1</sup>. The flow of N<sub>2</sub> was  
223 maintained at 1.5 ml min<sup>-1</sup> and the drift tube was set at 45°C. The total chromatography run  
224 time was of 54 min per sample. PL and TAG were identified by comparison to retention time  
225 of pure standards, corresponding to 3 min for triolein and 27; 28; 29; 37 and 38 min for PG;  
226 PE; PA; PS and PC respectively.

227

## 228 2.5. Lipase assay

229

230 After 6 weeks of incubation, the M1 medium containing *Rhizophagus irregularis*  
231 samples was dissolved in 1 volume of Tris-HCl (50 mM - EDTA 10 mM pH 7.5). The fungus  
232 was grinded in liquid N<sub>2</sub> and extracted in 1 ml of sucrose-triton extraction buffer (STEB)  
233 containing 20 mM Tris-HCl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM β-  
234 mercaptoethanol, 10% sucrose and 0.1% Triton X-100, at pH 8.0 (Sen & Hepper, 1986). After  
235 centrifugation at 16000 rpm during 20 min at 4°C, the upper phase was recovered and stored  
236 at -80°C before lipase assay and determination of protein content.

237 Lipase (EC 3.1.1.3.) assay was based on the spectrophotometric method described by  
238 Pinsirodom & Parkin (2001) with some modifications. For each sample, 0.5 ml of 0.1 M Tris-  
239 HCl buffer, pH 8.2 and 0.5 ml of 420 μM *p*-nitrophenyl palmitate substrate solution  
240 containing sodium dodecyl sulfate (SDS) and Triton X-100 (17 mg and 1 g respectively in  
241 100 ml H<sub>2</sub>O) heated at 65°C during 15 min (until total dissolution of SDS), were added to  
242 0.15 ml of the crude cell-free extract. The blank consisted of 0.15 ml of the crude cell-free  
243 extract with 1 ml of 0.1 M Tris-HCl buffer and without *p*-nitrophenyl palmitate solution.

244 After incubation in a water bath at 37°C during 60 min, lipase activity was visualized  
245 immediately in spectrophotometer at 410 nm. Lipase activity was determined thanks to the *p*-  
246 nitrophenol released after *p*-nitrophenyl palmitate hydrolysis. The *p*-nitrophenol was  
247 quantified according to a standard curve realized with *p*-nitrophenol from 0.001 to 0.05 mM  
248 in Tris-HCl buffer.

249 Lipase activity was calculated as:

$$250 \quad \text{Lipase activity (U } \mu\text{l}^{-1}) = [\text{ sample } ] * a / 60$$

251 with:  $[\text{ sample } ] \text{ (mmol l}^{-1})$  = the concentration of *p*-nitrophenol released after  
252 hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate by lipases.

253  $a$  = dilution factor

254  $60$  = reaction time (min)

255 The lipase activity was then reported to protein content and expressed in U mg<sup>-1</sup> of  
256 protein and the experiment was assayed on 5 replicates.

257

258 Total proteins concentrations were determined in supernatants using the Total Protein  
259 Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA).

260 The experiment was assayed on the same 5 replicates as for lipase assay.

261

## 262 2.6. Statistical analysis

263

264 Data (radioactivity of labelled lipids, PL and TAG quantities as well as lipase assay)  
265 of *Rhizophagus irregularis* grown in the presence or the absence of PAHs (anthracene and  
266 B[a]P) were compared. ANOVA was carried out using Statgraphics release 5.1 (Manugistic,  
267 Inc., Rockville, MD, USA). The method used to discriminate between the means was the LSD  
268 test ( $p \leq 0.05$  or  $0.1$ ). Levene's test of variance homogeneity was checked before the use of the

269 multiple comparison procedure. Percentages were converted to arcsine values before the  
270 analysis of ANOVA and LSD test.

271

### 272 3. Results and discussion

273

274 [1-<sup>14</sup>C]acetate incorporation in the extraradical mycelium of *Rhizophagus irregularis*  
275 total lipids, grown in the absence (control) and in the presence of anthracene and B[a]P at the  
276 concentration of 280 µM is presented in the Fig. 1. In the absence of PAHs, [1-<sup>14</sup>C]acetate  
277 incorporation in the total lipids reached more than 287000 CPM mg<sup>-1</sup> of dry weight  
278 suggesting active lipid biosynthesis in the external mycelium. This result is in accordance  
279 with the studies of Beilby (1983); Fontaine *et al.* (2001a,b) and Trépanier *et al.* (2005) who  
280 showed the [1-<sup>14</sup>C]acetate incorporation in external mycelium of *Glomus caledonium* and  
281 *Glomus intraradices* lipids, particularly in FA and sterols. However, Pfeffer *et al.* (1999)  
282 reported little or no storage lipid production occurring in arbuscular mycorrhizal extraradical  
283 fungal structures incubated in the presence of [1 or 2-<sup>13</sup>C]acetate during 8 weeks and  
284 analyzed using nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometry. As mentioned by Bago *et*  
285 *al.* (1999), this discordance in the result may reflect either the much greater sensitivity of  
286 radiotracer methods or the different timing of the experiments.

287 In the presence of PAHs, [1-<sup>14</sup>C]acetate incorporation in the total lipids decreased by  
288 55 and 61.5% in the presence of anthracene and B[a]P respectively. After checking the active  
289 and uniform uptake (an average of 73 %) of the exogenous [1-<sup>14</sup>C]acetate by the AMF grown  
290 in the presence and in the absence of PAHs (results not shown), it was suggested that the  
291 PAH-exposed AMF modified the acetate incorporation flux distribution by reorientating the  
292 radiolabelled acetate in other metabolic pathways detrimental to lipids.

293

## 294 3.1. PAHs affect membrane lipid metabolism

295

296 It was found that [1-<sup>14</sup>C]acetate incorporation decreased by 57 and 54% for PL and by  
297 43 and 15% for 4-demethylsterols in the presence of anthracene and B[a]P respectively (Fig.  
298 2). This result suggests an inhibition in membrane lipid biosynthesis pathway in the presence  
299 of PAHs.

300 All the classes of sterols (squalene, 4,4-dimethylsterols, 4 $\alpha$ -methylsterols and 4-  
301 demethylsterols) were labelled, but most of the acetate radioactivity was recovered in 4-  
302 demethylsterols, the end-products of the sterol pathway. So as to understand the origin of the  
303 tendency of [1-<sup>14</sup>C]acetate incorporation in the end product sterol inhibition in the presence of  
304 PAHs (Fig. 2), the [1-<sup>14</sup>C]acetate incorporation in the sterol precursors (squalene, 4,4-  
305 dimethylsterols and 4 $\alpha$ -methylsterols) was studied (Table 1). Whereas PAHs did not affect the  
306 incorporation of radiolabelled acetate in squalene and 4,4-dimethylsterols, 4 $\alpha$ -methylsterols  
307 incorporate in a lesser extent [1-<sup>14</sup>C]acetate, up to 41 and 35% in the presence of anthracene  
308 and B[a]P respectively, as compared to the control. This result seems indicate a slow down in  
309 the sterol biosynthesis pathway upstream the 4 $\alpha$ -methylsterols. This finding is in agreement  
310 with a previous work which reported decreases in the 4-demethylsterols content in *Glomus*  
311 *irregularare* exposed to anthracene and B[a]P (Debiane *et al.*, 2011). Sterols contribute to the  
312 normal functioning of the plasma membranes (fluidity regulation and permeability) which are  
313 correlated with the mycelial growth and physiology of fungi (Weete, 1989; Vanden Bossche,  
314 1990; Sancholle *et al.*, 2001). Recently, it was shown that the inhibition of the sterol  
315 metabolism of *Glomus irregularare* grown in the presence of sterol biosynthesis inhibitor  
316 fungicides resulted in an inhibition of its development (Campagnac *et al.*, 2008, 2009;  
317 Calonne *et al.*, 2012). Moreover, morphological and aberrant changes in other groups of fungi  
318 such as *Candida albicans* and in some Mucorales was explained by variation in the sterol

319 composition and contents (Martin & Konopka, 2004; Mysyakina & Funtikova, 2007), these  
320 lipids regulating the chitin synthetase activity (Mysyakina & Funtikova, 2007; Mysyakina &  
321 Feofilova, 2011). Thus, the sterol biosynthesis slow down demonstrated in our experiment  
322 could explain PAH toxicity observed on the fungal development, highlighted by drastic  
323 decreases in hyphal length as well as spore formation in a previous study (Debiane *et al.*,  
324 2011). Since sterol biosynthesis slows down in the presence of PAHs, it can be assumed that  
325 the AMF uses its sterol esters in order to regenerate the 4-demethylsterols in the membranes.  
326 Indeed, these sterol storage lipids which represent 40% of the total sterols in *Glomus*  
327 *intraradices* (Fontaine *et al.*, 2001) could be hydrolyzed in order to offset the sterol content  
328 decrease.

329

330 Contrary to the extraradical sterol biosynthesis, PL biosynthesis in the extraradical  
331 AMF is not described at all in the literature. It can however be assumed that the biosynthesis  
332 pathway steps of the PL is similar to those reported on other oleaginous fungi, as *Mortierella*  
333 *alpina*, (Wang *et al.*, 2011) considering TAG as extraradical PL precursor.

334 Our results showed that the decreases of acetate incorporation in total PL resulted  
335 from disruptions observed in some individual PL (Table 2). Whereas the [1-<sup>14</sup>C]acetate  
336 incorporation in PE in the presence of anthracene and in PG in the presence of both PAHs  
337 decreased, the incorporation in PC-PS not separated in our experimental conditions  
338 significantly increased by 54.5% in the presence of B[a]P. The last result suggests the  
339 activation of PC-PS metabolism. As in our experimental conditions, the FC contained mainly  
340 ungerminated spores as demonstrated by Debiane *et al.* (2011), the mixture of PC-PS should  
341 thus be predominantly composed of PC, which was described as the major PL in the AMF, in  
342 particular, in ungerminated spores (Beilby & Kidby, 1980a; Debiane *et al.*, 2011).

343 The low molecular weight PAH, anthracene, affects neither total PL nor each PL  
344 content (Table 3). In contrast, total *Rhizophagus irregularis* PL quantities decreased by 53.5%  
345 in the presence of B[a]P, mainly due to PC and PG content decreases. Indeed, PG content was  
346 significantly reduced by 68% in the presence of this pollutant indicating the slow down of its  
347 biosynthesis pathway highlighted by [1-<sup>14</sup>C]acetate incorporation reduction in the presence of  
348 B[a]P. Evaluation of the [1-<sup>14</sup>C]acetate incorporation in PA and PA content, PA being the PG,  
349 PS and PI precursor (via the cytidine diphosphate (CDP)-DAG pathway), (Table 4) showed  
350 an increase of [1-<sup>14</sup>C]acetate incorporation by 60% in PA in the presence of B[a]P, whereas  
351 its amount decreased in the presence of anthracene and B[a]P by 55 and by 51% respectively,  
352 in comparison to the control. These results suggest the activation of PA metabolism in the  
353 presence of PAHs in order to offset the degradation of this precursor. On the other hand, our  
354 results demonstrated that [1-<sup>14</sup>C]acetate incorporation decreased in PG, suggesting the slow  
355 down of the CDP-DAG pathway. One of the hypotheses will be the use of PA in other  
356 metabolisms as those involved in stress signalling, detrimental to PL metabolism (Munnik,  
357 2001; H-B. Shao *et al.*, 2007).

358 In contrast to PG, PC quantity decreased by 48% whereas [1-<sup>14</sup>C]acetate increased in  
359 the presence of B[a]P. These data could indicate that the AMF promotes its biosynthesis  
360 probably in order to regenerate the major PL altered by the high molecular weight PAH as  
361 revealed by the lipid peroxidation highlighted by the MDA overproduction and by the  
362 decrease in PC quantity in *Glomus irregulare* (Debiane *et al.*, 2011). According to the  
363 previous results, it was suggested an increase in PC degradation and/or a decrease in its  
364 synthesis when *Glomus irregulare* grown under anthracene and B[a]P pollution. The results  
365 presented herein invalidate the second hypothesis and confirms that PC content decrease is  
366 caused by the induced oxidative stress, under PAHs treatment.

367



## 368 3.2. PAHs affect TAG metabolism

369

370 Contrary to membrane lipids where [1-<sup>14</sup>C]acetate incorporation was reduced in the  
371 presence of both PAHs tested, the [1-<sup>14</sup>C]acetate incorporation was increased by 69% in  
372 TAG, only in the presence of B[a]P, suggesting an activation of the AMF TAG biosynthesis  
373 pathway, when grown in the presence of the high molecular weight PAH.

374 Despite the TAG biosynthesis activation in the presence of B[a]P, its quantity  
375 decreased by 59% in the extraradical AMF when *Rhizophagus irregularis* was exposed to this  
376 pollutant (Fig. 3), whereas TAG content was not significantly affected in the presence of  
377 anthracene. The concomitant increase of [1-<sup>14</sup>C]acetate incorporation in TAG in the  
378 extraradical mycelium of *Rhizophagus irregularis* (Fig. 2) with the content decrease suggests  
379 TAG metabolism activation probably to offset the decrease in storage lipid content, in the  
380 presence of B[a]P. Moreover, the TAG content decrease could be a consequence of their  
381 active degradation. In fact, our results showed that while *Rhizophagus irregularis* lipase  
382 activity remained unchanged in the presence of anthracene, the activity was induced more  
383 than 5 folds in the presence of B[a]P in comparison to the control (Fig. 3). A good correlation  
384 between lipase activity and TAG content validates the hypothesis by which TAG could be  
385 actively hydrolysed in the presence of B[a]P. TAG is located in lipid bodies, which were  
386 reported to play key roles in fungal morphogenic and reproductive events such as sporulation  
387 as reported by Bago *et al.* (2002b). The active TAG hydrolysis in the presence of B[a]P could  
388 explain the hyphal and the sporulation inhibition in the presence of PAHs reported by  
389 Debiane *et al.* (2011).

390

391

392

## 393 3.3. Correlation between lipid metabolism and the fight against PAH-induced oxidative stress

394

395         Several assumptions could explain the relevance of the activation of TAG catabolism  
396 in the AMF after exposition to PAHs. Firstly, in order to regenerate membranes, damaged in  
397 the presence of PAHs, TAG could be actively hydrolysed. Indeed, probably TAG  
398 incorporated high level of radioactivity in order to offset the decrease of TAG amounts. This  
399 hypothesis is also confirmed by PC (the major PL), which incorporated significantly more [1-  
400 <sup>14</sup>C]acetate in the presence of PAHs, suggesting one time again the offset of the PC quantity  
401 decrease. Indeed, in the extraradical mycelium, PL are probably originated from the  
402 hydrolytic activity of TAG pointed out owing to lipase activity induction. Tunlid & White  
403 (1992) and Gaspar *et al.* (2001) reported that the increase of the external mycelium and its PL  
404 content suggests that the hydrolytic activity of TAG in *Glomus mosseae* mycelium contributes  
405 to the provision of carbon skeletons and energy necessary for PL synthesis and membrane  
406 formation. In the same way, Gaspar *et al.* (1994) found that TAG quantity decreased whereas  
407 PL and FFA contents increased continually during the spore germination and germ tube  
408 development. Moreover, the AMF concentration of neutral lipid FA (NLFAs) decreased  
409 relatively to polar lipid FA (PLFAs) concentration increase, within one week of disconnection  
410 to host roots (Olsson *et al.*, 1995). Furthermore, the energy provided from the TAG hydrolysis  
411 originates from the glycolysis as well as the tricarboxylic acid cycle [active in the AMF  
412 extraradical mycelium (Bago *et al.*, 1999; Pfeffer *et al.*, 1999)]. These two mechanisms  
413 perform a dual role in organisms: to produce energy and reducing equivalents in the form of  
414 ATP, NADH or NADPH and to provide building blocks to synthesize other biomolecules  
415 (Flores *et al.*, 2000). The energy provided may not only be used in PL synthesis but also in  
416 PAH translocation and degradation. Indeed, many works showed that different fungal species,  
417 including AMF, were able to take up and store PAHs in the lipid vesicles (Verdin *et al.*,

418 2005a, 2006; Wu *et al.*, 2009; Furuno *et al.*, 2012; Thion *et al.*, 2012), rich in storage lipids,  
419 such as TAG. However the fate of the PAHs bioaccumulated in lipid vesicles is still  
420 unknown: this mechanism could be a strategy of protection for fungi themselves against  
421 PAHs toxicity (Thion *et al.*, 2012) and consequently could be involved in the protection  
422 strategy for the host plant against PAHs toxicity, preventing pollutant translocation in root. In  
423 order to reach vesicles, the PAHs could move by passive translocation (i.e., diffusion) as well  
424 as by active, metabolically driven transport, the two mechanisms of nutrient translocation  
425 being described in the literature (Olsson, 1995). The active TAG degradation could be linked  
426 with the energy production in order to actively translocate B[a]P after the passage through the  
427 cell wall into the cytoplasm until reaching the vesicles. Moreover, as reported by Thion *et al.*  
428 (2012), the fate of internalised PAHs could be a transitory storage until oxidation by  
429 enzymatic systems of detoxification, such as the cytochrome P450 monooxygenase pathway  
430 described in *Fusarium solani* (Verdin *et al.*, 2004, 2005b). Verdin *et al.* (2006) demonstrated  
431 that whereas a fraction of the dissipated PAHs by the mycorrhizal chicory roots was  
432 bioaccumulated in the lipid bodies in the AMF mycelium, the second part was biodegraded.

433         Secondly, TAG degradation could have a protective role against the B[a]P-induced  
434 stress. The TAG degradation could also give carbon skeleton leading to PA biosynthesis. PA  
435 was demonstrated to act as a second messenger to amplify or refine stress signalling involving  
436 in various cellular processes like stress defence (Munnik, 2001; H-B. Shao *et al.*, 2007). The  
437 PA potential targets were identified as essential enzymes as kinases, phosphatases and 14-3-3  
438 proteins (Testerink *et al.*, 2004; Boudsocq & Lauriere, 2005). 14-3-3 protein family plays a  
439 central role in biotic (as bacterial and fungal pathogen attack) and abiotic (as fluctuation in  
440 temperature and nutrient level, osmotic and salt) stress responses (Roberts *et al.*, 2002). The  
441 up-regulation of *Gil4-3-3*, a gene encoding 14-3-3 proteins, under conditions of water deficit  
442 indicated that this fungal gene had a role in the protection of the AMF *Glomus intraradices*

443 against the abiotic stress (Porcel *et al.*, 2006). The second explanation for the potential  
444 protective effect resulting from TAG degradation could be the production of hexose. The  
445 TAG degradation leads to free fatty acids (FFA) release, and when FFA are converted in  
446 acetyl-CoA, they could enter in hexose metabolism. Gluconeogenic C fluxes in the  
447 extraradical mycelium to produce hexose via the glyoxylate cycle, the precursor of trehalose  
448 (Bago *et al.*, 1999; Pfeiffer *et al.*, 1999; Lammers *et al.*, 2001) are very substantial, and that is  
449 mainly fuelled by the consumption of storage lipids (Bago *et al.*, 2002a). The trehalose was  
450 described to play an important physiological role as protectant against abiotic stress (Van  
451 Laere, 1989; J.H. Crowe *et al.*, 1992; Iwahashi *et al.*, 2000; Zähringer *et al.*, 2000; Ocón *et*  
452 *al.*, 2007), and could thus protect the AMF against the PAH stress. Moreover, chitin is made  
453 from hexose in the extraradical mycelium (Bago *et al.*, 2000, 2003) and is one of the main cell  
454 wall component in AMF (Bonfante-Fasolo & Gripiolo, 1984; Grandmaison *et al.*, 1988;  
455 Bonfante-Fasolo *et al.*, 1990; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1994; Bago *et al.*, 1996). Chitin  
456 constitutes a physical and chemical barrier which isolates the fungal cytoplasm from its  
457 environment and allows fungi to resist adverse external conditions (Bago *et al.*, 1996).  
458 Recently, Debiane *et al.* (2011) observed that whereas spore production as well as fungal  
459 hyphal length were decreased significantly, *Glomus irregulare* fungal biomass was not  
460 affected by the presence of the pollutants. This observation could suggest that the fungal cell  
461 walls became thick when the AMF was grown under PAHs stress (Debiane *et al.*, 2011). One  
462 might expect that the TAG hydrolysis in AMF grown in the presence of PAHs could result in  
463 an increased chitin synthesis in order to reinforce the cell wall and block the PAH entrance in  
464 the AMF.

465

466 Finally, it is worth to note that our data highlighted more disruptions in the AMF  
467 extraradical lipid metabolism in the presence of B[a]P as compared to anthracene, indicating

468 that B[a]P exhibited a higher toxicity against the AMF lipid metabolism than anthracene. This  
469 result is in agreement with previous study which reported a higher negative B[a]P effect on  
470 the main stages of *Glomus irregulare* life cycle (Debiane *et al.*, 2011).

471 In conclusion, the whole of the results presented in the paper contributed to explain  
472 how PAHs act on the lipid metabolism in the extraradical *Rhizophagus irregularis* and how  
473 the AMF deal with the PAHs toxicity (Fig. 6). It was showed that TAG biosynthesis was  
474 activated in the presence of B[a]P, probably in order to offset their degradation by lipase  
475 induction in the presence of the high molecular weight PAH. Two assumptions can be issued  
476 to explain TAG degradation by the AMF in the presence of B[a]P : (i) it could provide carbon  
477 skeletons and energy (via the glycolysis and the TCA cycle) required for either PL synthesis  
478 and membrane formation or for B[a]P translocation and degradation, (ii) it could supply PA  
479 biosynthesis, involved in various cellular processes as stress defence. Storage lipids  
480 hydrolysis could also release FFA involved in trehalose production, known to play important  
481 physiological roles not only as protectant against abiotic stress but also in chitin production in  
482 order to reinforce the cell wall and to prevent the PAHs translocation in the AMF. In order to  
483 validate these hypotheses, it could be interesting in the future to consider the study  
484 radiolabelled precursors in hexose, trehalose and chitin in the AMF extraradical mycelium  
485 after B[a]P exposure. In addition, it will be of interest to investigate the ability of  
486 *Rhizophagus irregularis* to degrade B[a]P.

487

#### 488 **4. Acknowledgement**

489

490 In this paper, the first position is shared by the two co-authors: J. Fontaine and M.  
491 Calonne. The authors wish to thank the Syndicat Mixte de la Côte d'Opale (SMCO) and the  
492 French Ministry of National Education and Research for providing financial supports for M.

493 Calonne's Ph.D and D. Debiane's theses respectively. The laboratory participates in the  
494 Institut de Recherche en ENvironnement Industriel (IRENI) which is financed by the  
495 Communauté Urbaine de Dunkerque, the Région Nord Pas-de-Calais, the Ministère de  
496 l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the CNRS and European Regional  
497 Development Fund (ERDF).

498

499 **5. References**

500

501 **Alarcón A, Delgadillo-Martínez J, Franco-Ramírez A, Davies FT Jr, Ferrera-Cerrato R.**  
502 **2006.** Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and  
503 phytoremediation potential of *Gigaspora margarita-Echynochloa polystachya* symbiosis in  
504 benzo[a]pyrene-polluted substrate. *Revista internacional de contaminación ambiental* **22**: 39-  
505 47.

506 **Bago B, Chamberland H, Goulet A, Vierheilig H, Lafontaine J-G, Piché Y. 1996.** Effect  
507 of Nikkomycin Z, a chitin-synthase inhibitor, on hyphal growth and cell wall structure of two  
508 arbuscular mycorrhizal fungi. *Protoplasma* **192**: 80-92.

509 **Bago B, Pfeffer PE, Douds DD, Brouillette J, Bécard G, Shachar-Hill Y. 1999.** Carbon  
510 metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed  
511 by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology* **121**: 263-271.

512 **Bago B, Pfeffer, PE, Shachar-Hill Y. 2000.** Carbon metabolism and transport in arbuscular  
513 mycorrhizas. *Plant Physiology* **124**: 949-957.

514 **Bago B, Pfeffer PE, Zipfel W, Lammers P, Shachar-Hill Y. 2002a.** Tracking metabolism  
515 and imaging in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **244**: 189-197.

516 **Bago B, Zipfel W, Williams RM, Jun J, Arreola R, Lammers PJ, Pfeffer PE, Shachar-**  
517 **Hill Y. 2002b.** Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular

- 518 mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* **128**: 108-124.
- 519 **Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers**  
520 **PJ, Shachar-Hil Y. 2003.** Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the  
521 translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology* **131**: 1496-1507.
- 522 **Bécard G, Fortin JA. 1988.** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on  
523 RiT-DNA transformed roots. *New Phytologist* **108**: 211-218.
- 524 **Bécard G, Doner LW, Rolin DB, Douds DD, Pfeffer PE. 1991.** Identification and  
525 quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by *in-vivo* <sup>13</sup>C NMR and  
526 HPLC analyses. *New Phytologist* **118**: 547-552.
- 527 **Beilby JP. 1980.** Fatty acid and sterol composition of ungerminated spores of the vesicular-  
528 arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora laevis*. *Lipids* **15**: 949-952.
- 529 **Beilby JP. 1983.** Effects of inhibitors on early protein, RNA, and lipid synthesis in  
530 germinating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores of *Glomus caledonium*. *Revue*  
531 *Canadienne de Microbiologie* **29**: 596-601.
- 532 **Beilby JP, Kidby DK. 1980a.** Biochemistry of ungerminated and germinated spores of the  
533 vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus caledonius*: changes in neutral and polar  
534 lipids. *Journal of Lipid Research* **21**: 739-750.
- 535 **Beilby JP, Kidby DK. 1980b.** Sterol composition of ungerminated and germinated spores of  
536 the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Lipids* **15**: 375-378.
- 537 **Bonfante-Fasolo P, Grippiolo R. 1984.** Cytochemical and biochemical observations of the  
538 cell wall of the spore of *Glomus epigaeum*. *Protoplasma* **123**: 140-151.
- 539 **Bonfante-Fasolo P, Faccio A, Perotto S, Schubert A. 1990.** Correlation between chitin  
540 distribution and cell wall morphology in the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*.  
541 *Mycological Research* **94**: 157-165.

- 542 **Boudsocq M, Laurière C. 2005.** Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by  
543 emerging kinase families. *Plant Physiology* **138**: 1185-1194.
- 544 **Calonne M, Fontaine J, Debiane D, Laruelle F, Grandmougin-Ferjani A, Lounès-Hadj**  
545 **Sahraoui A. 2010.** Propiconazole toxicity on the non-target organism, the arbuscular  
546 mycorrhizal fungus, *Glomus irregulare*. In: Carisse O, ed. *Fungicides*. InTech, Rijeka, 325-  
547 346.
- 548 **Calonne M, Lounès-Hadj Sahraoui A, Campagnac E, Debiane D, Laruelle F,**  
549 **Grandmougin-Ferjani A, Fontaine J. 2012.** Propiconazole inhibits the sterol 14 $\alpha$ -  
550 demethylase in *Glomus irregulare* like in phytopathogenic fungi. *Chemosphere* **87**: 376-383.
- 551 **Campagnac E, Fontaine J, Lounès-Hadj Sahraoui A, Laruelle F, Durand R,**  
552 **Grandmougin-Ferjani A. 2008.** Differential effects of fenpropimorph and fenhexamid, two  
553 sterol biosynthesis inhibitor fungicides, on arbuscular mycorrhizal development and sterol  
554 metabolism in carrot roots. *Phytochemistry* **69**: 2912-2919.
- 555 **Campagnac E, Fontaine J, Lounès-Hadj Sahraoui A, Laruelle F, Durand R,**  
556 **Grandmougin-Ferjani A. 2009.** Fenpropimorph slows down the sterol pathway and the  
557 development of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* **19**: 365-  
558 374.
- 559 **Campagnac E, Lounès-Hadj Sahraoui A, Debiane D, Fontaine J, Laruelle F, Garçon G,**  
560 **Verdin A, Durand R, Shirali P, Grandmougin-Ferjani A. 2010.** Arbuscular mycorrhiza  
561 partially protect chicory roots against oxidative stress induced by two fungicides,  
562 fenpropimorph and fenhexamid. *Mycorrhiza* **20**: 167-178.
- 563 **Cooper KM, Lösel DM. 1978.** Lipid physiology of vesicular-arbuscular mycorrhiza. I.  
564 Composition of lipids in roots of onion, clover and ryegrass infected with *Glomus mosseae*.  
565 *New Phytologist* **80**: 143-151.



- 566 **Cooper KM, Tinker PB. 1978.** Translocation and transfer of nutrients in vesicular-  
567 arbuscular mycorrhizas. II. Uptake and translocation of phosphorus, zinc and sulphur. *New*  
568 *Phytologist* **81**: 43-52.
- 569 **Cox G, Sanders F. 1974.** Ultrastructure of the host-fungus interface in a vesicular-arbuscular  
570 mycorrhiza. *New Phytologist* **73**: 901-912.
- 571 **Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. 1992.** Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*  
572 **54**: 579-599.
- 573 **Dalpé Y. 2005.** Mycorrhizae: a potential tool for plant protection but not a panacea.  
574 *Phytoprotection* **86**: 53-59.
- 575 **Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Grandmougin-Ferjani A,**  
576 **Shirali P, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2008.** *In vitro* evaluation of the oxidative stress and  
577 genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environmental and*  
578 *Experimental Botany* **64**: 120-127.
- 579 **Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Shirali P, Grandmougin-**  
580 **Ferjani A, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2009.** Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-  
581 induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. *Phytochemistry* **70**: 1421-1427.
- 582 **Debiane D, Calonne M, Fontaine J, Laruelle F, Grandmougin-Ferjani A, Lounès-Hadj**  
583 **Sahraoui A. 2011.** Lipid content disturbance in the arbuscular mycorrhizal, *Glomus*  
584 *irregulare* grown in monoxenic conditions under PAHs pollution. *Fungal Biology* **115**: 782-  
585 792.
- 586 **Finlay RD. 2008.** Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the  
587 functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of*  
588 *Experimental Botany* **59**: 1115-1126.
- 589 **Flores C-L, Rodríguez C, Petit T, Gancedo C. 2000.** Carbohydrate and energy-yielding  
590 metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 507-529.

- 591 **Fontaine J, Grandmougin-Ferjani A, Hartmann M-A, Sancholle M. 2001a.** Sterol  
592 biosynthesis by arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Lipids* **36**: 1357-1363.
- 593 **Fontaine J, Grandmougin-Ferjani A, Sancholle M. 2001b.** Métabolisme lipidique du  
594 champignon endomycorhizien: *Glomus intraradices*. *Comptes Rendus de l'Académie des*  
595 *Sciences de la Vie/Life Science* **324**: 847-853.
- 596 **Franco-Ramírez A, Ferrera-Cerrato R, Varela-Fregoso L, Pérez-Moreno J, Alarcón A.**  
597 **2007.** Arbuscular mycorrhizal fungi in chronically petroleum-contaminated soils in Mexico  
598 and the effects of petroleum hydrocarbons on spore germination. *Journal of Basic*  
599 *Microbiology* **47**: 378-383.
- 600 **Furuno S, Foss S, Wild E, Jones KC, Semple KT, Harms H, Wick LY. 2012.** Mycelia  
601 promote active transport and spatial dispersion of polycyclic aromatic hydrocarbons.  
602 *Environmental Science and Technology* **46**: 5463-5470.
- 603 **Gao Y, Ling W, Wong MH. 2006.** Plant-accelerated dissipation of phenanthrene and pyrene  
604 from water in the presence of a nonionic-surfactant. *Chemosphere* **63**: 1560–1567.
- 605 **Gao Y, Xiong W, Ling W, Wang H, Ren L, Yang Z. 2008.** Partitioning of polycyclic  
606 aromatic hydrocarbons between plant roots and water. *Plant and Soil* **311**: 201–209.
- 607 **Gaspar ML, Pollero RJ, Cabello MN. 1994.** Triacylglycerol consumption during spore  
608 germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of American Oil Chemistry*  
609 *Society* **71**: 449-452.
- 610 **Gaspar ML, Pollero RJ, Cabello MN. 2001.** Biosynthesis and degradation of glycerides in  
611 external mycelium of *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **11**: 257-261.
- 612 **Gaspar ML, Cabello MN, Cazau MC, Pollero RJ. 2002.** Effect of phenanthrene and  
613 *Rhodotorula glutinis* on arbuscular mycorrhizal fungus colonization of maize roots.  
614 *Mycorrhiza* **12**: 55-59.

- 615 **Gianinazzi-Pearson V, Lemoine M-C, Arnould C, Gollotte A, Morton JB. 1994.**  
616 Localization of [ $\beta$  (1  $\rightarrow$  3) glucans in spore and hyphal walls of fungi in the Glomales.  
617 *Mycologia* **86**: 478-485.
- 618 **Gordon PA, Stewart PR, Clark-Walker GD. 1971.** Fatty acid and sterol composition of  
619 *Mucor genevensis* in relation to dimorphism and anaerobic growth. *Journal of Bacteriology*  
620 **107**: 114–120.
- 621 **Grandmaison J, Benhamou N, Furlan V, Visser SA. 1988.** Ultrastructural localization of  
622 N-acetylglucosamine residues in the cell wall of *Gigaspora margarita* throughout its life-  
623 cycle. *Biology of the Cell* **63**: 89-100.
- 624 **Ito E, Cihlar RL, Inderlied CB. 1982.** Lipid synthesis during morphogenesis in *Mucor*  
625 *racemosus*. *Journal of Bacteriology* **153**: 880–887.
- 626 **Iwahashi H, Nwaka S, Obuchi K. 2000.** Evidence for contribution of neutral trehalase in  
627 barotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:  
628 5182–5185.
- 629 **Jabaji-Hare S. 1988.** Lipid and fatty acid profiles of some vesicular-arbuscular mycorrhizal  
630 fungi: contribution to taxonomy. *Mycologia* **80**: 622-629.
- 631 **Jabaji-Hare S, Deschene A, Kendrick B. 1984.** Lipid content and composition of vesicles  
632 of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycologia* **76**: 1024-1030.
- 633 **Joner EJ, Leyval C. 2001.** Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown  
634 together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza* **10**: 155-159.
- 635 **Kates M. 1972.** Techniques of Lipidology. In: Work TS, Work E, eds. *Laboratory*  
636 *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. New York, USA: North  
637 Holland/American Elsevier, 350, 436-438 .
- 638 **Lammers PJ, Jun J, Abubaker J, Arreola R, Gopalan A, Bago B, Hernandez-Sebastia C,**  
639 **Allen JW, Douds DD, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2001.** The glyoxylate cycle in an

- 640 arbuscular mycorrhizal fungus. Carbon Flux and gene expression. *Plant Physiology* **127**:  
641 1287-1298.
- 642 **Leyval C, Binet P. 1998.** Effect of polyaromatic hydrocarbons in soil on arbuscular  
643 mycorrhizal plants. *Journal of Environmental Quality* **27**: 402-407.
- 644 **Lubbehusen TL, Nielsen J, McIntyre M. 2003.** Morphology and physiology of the  
645 dimorphic fungus *Mucor circinelloides* (syn. *Mucor racemosus*) during anaerobic growth.  
646 *Mycological Research* **107**: 223–230.
- 647 **Martin SW, Konopka JB. 2004.** Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in  
648 *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **3**: 675-684.
- 649 **Meijer HJG, Munnik T. 2003.** Phospholipid-based signaling in plants. *Annual Review of*  
650 *Plant Biology* **54**: 265-306.
- 651 **Munnik T. 2001.** Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends in*  
652 *Plant Science* **6**: 227-233.
- 653 **Mysyakina IS, Funtikova NS. 2007.** The role of sterols in morphogenetic processes and  
654 dimorphism in fungi. *Microbiology* **76**: 1-13.
- 655 **Mysyakina IS, Feofilova EP. 2011.** The role of lipids in the morphogenetic processes of  
656 mycelial fungi. *Microbiology* **80**: 297-306.
- 657 **Ocón A, Hampp R, Requena N. 2007.** Trehalose turnover during abiotic stress in arbuscular  
658 mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **174**: 879-891.
- 659 **Ohlrogge J, Browse J. 1995.** Lipid biosynthesis. *The Plant Cell* **7**: 957-970.
- 660 **Palmgren MG, Sommarin M. 1989.** Lysophosphatidylcholine stimulates ATP dependent  
661 proton accumulation in isolated oat root plasma membrane vesicles. *Plant Physiology* **90**:  
662 1009-1014.

- 663 **Pfeffer PE, Douds DD, Bécard G, Shachar-Hill Y. 1999.** Carbon uptake and the  
664 metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* **120**: 587-  
665 598.
- 666 **Pinsirodom P, Parkin KL. 2001.** Lipase assay. In: Wrolstad RE, Acree TE, Decker EA,  
667 Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Smith DM, Sporns P; eds. *Current*  
668 *Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons, Inc, New York.
- 669 **Porcel R, Aroca R, Cano C, Bago A, Ruiz-Lozano JM. 2006.** Identification of a gene from  
670 the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* encoding for a 14-3-3 protein that is  
671 up-regulated by drought stress during the AM symbiosis. *Microbial Ecology* **52**: 575-582.
- 672 **Roberts MR, Salinas J, Collinge DB. 2002.** 14-3-3 proteins and the response to abiotic and  
673 biotic stress. *Plant Molecular Biology* **1031**: 1031-1039.
- 674 **Sancholle M, Dalpé Y, Grandmougin-Ferjani A. 2001.** Lipids of mycorrhizae. In: Esser K,  
675 Hock B, eds. *The Mycota IX. Fungal Association*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 63-  
676 93.
- 677 **Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. 2001.** A new phylum, the Glomeromycota:  
678 phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**: 1413-1421.
- 679 **Schüßler A, Walker C. 2010.** The Glomeromycota. A species list with new families and new  
680 genera. libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew,  
681 Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. 59 p.
- 682 **Schützendübel A, Polle A. 2002.** Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced  
683 oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1351-  
684 1365.
- 685 **Sen R, Hepper CM. 1986.** Characterization of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi  
686 (*Glomus spp.*) by selective enzyme staining following polyacrylamide gel electrophoresis.  
687 *Soil Biology and Biochemistry* **18**: 29-34.

- 688 **Shao H-B, Jiang S-Y, Li F-M, Chub L-Y, Zhao C-X, Shao M-A, Zhao X-N, Li F. 2007.**  
689 Some advances in plant stress physiology and their implications in the systems biology era.  
690 *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **54**: 33-36.
- 691 **Smith S, Read D. 2008.** *Mycorrhizal Symbiosis*, third ed. Cambridge, UK: Academic Press.
- 692 **Starai VJ, Escalante-Seremena JC. 2004.** Acetyl-coenzyme A synthetase (AMP forming).  
693 *Cellular and Molecular Life Science* **61**: 2020-2030
- 694 **St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA. 1996.** Enhanced hyphal growth  
695 and spore production of the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro*  
696 system in the absence of host roots. *Mycological Research* **100**: 328-332.
- 697 **Sung K, Munster CL, Rhykerd R, Drew MC, Corapcioglu MY. 2002.** The use of box  
698 lysimeters with freshly contaminated soils to study the phytoremediation of recalcitrant  
699 organic contaminants. *Environmental Science and Technology* **36**: 2249–2256.
- 700 **Testerink C, Dekker HL, Lim ZY, Johns MK, Holmes AB, Koster CG, Ktistakis NT,**  
701 **Munnik T. 2004.** Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants. *Plant*  
702 *Journal* **39**: 527-536.
- 703 **Thion C, Cébron A, Beguiristain T, Leyval C. 2012.** PAH biotransformation and sorption  
704 by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* isolated from a polluted soil in axenic cultures  
705 and mixed co-cultures. *International Biodeterioration & Biodegradation* **68**: 28-35.
- 706 **Trépanier M, Bécart G, Moutoglis P, Willemot C, Gagné S, Avis TJ, Rious J-A. 2005.**  
707 Dependence of arbuscular mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis.  
708 *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 5341-5347.
- 709 **Tunlid A, White DC. 1992.** Biochemical analysis of biomass, community structure,  
710 nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. In: Stotzky G,  
711 Bollag JM., eds. *Soil Biochemistry*. Decker, New York, 229-262.

- 712 **Vanden Bossche H. 1990.** Importance and role of sterols in fungal membranes. In Kuhn PJ,  
713 Trinci APJ, Jung MJ, Goosey MW, Copping LG, eds. *Biochemistry of cell walls and*  
714 *membranes in fungi*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 135-157.
- 715 **Van Laere A. 1989.** Trehalose, reserve and/or stress metabolite? *FEMS Microbiology Review*  
716 **63**: 201–210.
- 717 **Verdin A, Lounès-Hadj Sahraoui A, Durand R. 2004.** Degradation of benzo[a]pyrene by  
718 mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *International Biodeterioration &*  
719 *Biodegradation* **53**: 65-70.
- 720 **Verdin A, Lounès-Hadj Sahraoui A, Newsam R, Robinson G, Durand R. 2005a.**  
721 Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles.  
722 *Environmental Pollution* **133**: 283-291.
- 723 **Verdin A, Lounès-Hadj Sahraoui A, Robinson G, Durand R. 2005b.** Effect of the  
724 polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo[a]pyrene, on the intracellular protein composition of  
725 *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*  
726 **55**: 171-174.
- 727 **Verdin A, Lounès-Hadj Sahraoui A, Fontaine J, Grandmougin-Ferjani A, Durand R.**  
728 **2006.** Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and  
729 contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza* **16**: 397-405.
- 730 **Weete JD. 1989.** Structure and function of sterols in fungi. *Advances in Lipid Research* **23**:  
731 115-167.
- 732 **Wild SR, Berrow ML, Jones KC. 1991a.** The Persistence of polynuclear aromatic  
733 hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge amended agricultural soils. *Environmental Pollution*  
734 **72**: 141-157.

735 **Wild SR, Obbard JP, Munn CI, Berrow ML, Jones KC. 1991b.** The long-term persistence  
736 of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in an agricultural soil amended with metal-  
737 contaminated sewage sludges. *Science of the Total Environnement* **101**: 235-253.

738 **Wu YR, He TT, Lun JS, Maskaoui K, Huang TW, Hu Z. 2009.** Removal of  
739 benzo[a]pyrene by a fungus *Aspergillus* sp. BAP14. *World Journal of Microbiology and*  
740 *Biotechnology* **25**: 1395-1401.

741 **Zähringer H, Thevelein JM, Nwaka S. 2000.** Induction of neutral trehalase Nth1 by heat  
742 and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors:  
743 variations of PKA effect during stress and growth. *Molecular Microbiology* **35**: 397-406.



PAHs			
	Control	Anthracene	B[a]P
Sterol precursors	cpm mg <sup>-1</sup> dry weight	cpm mg <sup>-1</sup> dry weight	cpm mg <sup>-1</sup> dry weight
Squalene	1073 ± 452 <sup>a</sup>	1744 ± 231 <sup>a</sup>	1611 ± 261 <sup>a</sup>
4,4-dimethylsterols	13584 ± 4731 <sup>a</sup>	8986 ± 1188 <sup>a</sup>	6401 ± 3519 <sup>a</sup>
4 $\alpha$ -methylsterols	1498 ± 176 <sup>a</sup>	887 ± 165 <sup>b</sup>	968 ± 9 <sup>b</sup>

Table 1. Incorporation of radioactivity from [1-<sup>14</sup>C]acetate (cpm mg<sup>-1</sup> of dry weight) into sterol precursors of *Rhizophagus irregularis* grown in the FC of bi-compartmental Petri dish, during 6 weeks in the absence (control) or in the presence of anthracene and benzo[a]pyrene (B[a]P), after 72h of incubation with [1-<sup>14</sup>C]acetate. Data are presented as means ± SD. Different letters indicate significant differences between the control and PAH treatment, as determined by ANOVA followed by a multiple range test (LSD) (p≤0.1).

PAHs			
	Control	Anthracene	B[a]P
PL	cpm mg <sup>-1</sup> dry weight	cpm mg <sup>-1</sup> dry weight	cpm mg <sup>-1</sup> dry weight
PC-PS	255 ± 15 <sup>a</sup>	245 ± 137 <sup>a</sup>	395 ± 32 <sup>b</sup>
PE	92 ± 8 <sup>a</sup>	63 ± 9 <sup>b</sup>	88 ± 22 <sup>a</sup>
PG	197 ± 13 <sup>a</sup>	83 ± 19 <sup>b</sup>	102 ± 25 <sup>b</sup>

Table 2. Incorporation of radioactivity from [1-<sup>14</sup>C]acetate (cpm mg<sup>-1</sup> of dry weight) into PL (phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), in the different PL classes) of *Rhizophagus irregularis* grown in the FC of bi-compartmental Petri dish, during 6 weeks in the absence (control) or in the presence of anthracene and benzo[a]pyrene (B[a]P), after 72h of incubation with [1-<sup>14</sup>C]acetate. Data are presented as means ± SD. Different letters indicate significant differences between the control and PAH treatment, as determined by ANOVA followed by a multiple range test (LSD) (p≤0.1).

- indicates that PC and PS were not separated in our experimental conditions.

PAHs			
	Control	Anthracene	B[a]P
PL	μg mg <sup>-1</sup> dry weight	μg mg <sup>-1</sup> dry weight	μg mg <sup>-1</sup> dry weight
PC	3.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	3 ± 0.3 <sup>ab</sup>	1.9 ± 0.5 <sup>b</sup>
PE	0.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.3 <sup>a</sup>
PG	1.5 ± 0.8 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.6 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.3 <sup>b</sup>
PS	1.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.8 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>a</sup>
Total PL	7.9 ± 3.5 <sup>a</sup>	7 ± 2 <sup>ab</sup>	3.5 ± 1.2 <sup>b</sup>

Table 3. Phospholipids (PL) [phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylserine (PS)] composition and contents (μg mg<sup>-1</sup> of dry weight) of *Rhizophagus irregularis* grown in the FC of bi-compartmental Petri dish, during 6 weeks in the absence (control) or in the presence of anthracene and benzo[a]pyrene (B[a]P). Data are presented as means ± SD. Different letters indicate significant differences between the control and PAH treatment for each lipid separately, as determined by ANOVA followed by a multiple range test (LSD) (p≤0.05).

	PAHs		
	Control	Anthracene	B[a]P
PA (cpm mg <sup>-1</sup> dry weight)	109 ± 15 <sup>a</sup>	108 ± 17 <sup>a</sup>	175 ± 41 <sup>b</sup>
PA (µg mg <sup>-1</sup> dry weight)	6.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.9 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.1 ± 1.3 <sup>b</sup>

Table 4. Incorporation of radioactivity from [1-<sup>14</sup>C]acetate (cpm mg<sup>-1</sup> of dry weight) into phosphatidic acid (PA) and PA contents (µg mg<sup>-1</sup> of dry weight) of *Rhizophagus irregularis* grown in the FC of bi-compartmental Petri dish, during 6 weeks in the absence (control) or in the presence of anthracene and benzo[a]pyrene (B[a]P), after 72h of incubation with [1-<sup>14</sup>C]acetate. Data are presented as means ± SD. Different letters indicate significant differences between the control and PAH treatment, as determined by ANOVA followed by a multiple range test (LSD) (p≤0.05 and 0.1).

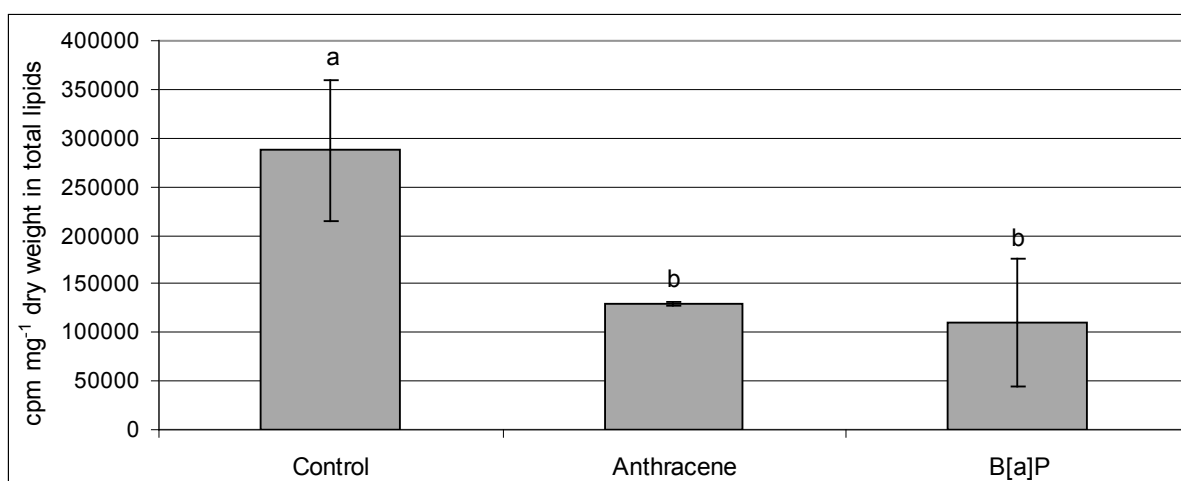


Fig. 1. Incorporation of radioactivity from [1-<sup>14</sup>C]acetate (cpm mg<sup>-1</sup> of dry weight) into total lipids of *Rhizophagus irregularis* grown in the FC of bi-compartmental Petri dish, during 6 weeks in the absence (control) or in the presence of anthracene and benzo[a]pyrene (B[a]P), after 72h of incubation with [1-<sup>14</sup>C]acetate. Data are presented as means ± SD. Different letters indicate significant differences between the control and PAH treatment, as determined by ANOVA followed by a multiple range test (LSD) (p≤0.1).

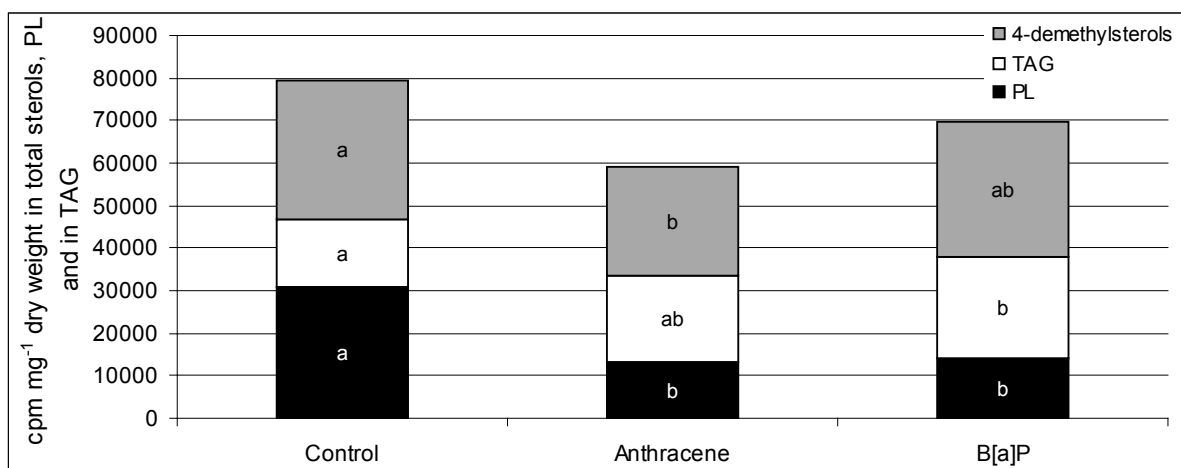


Fig. 2. Incorporation of radioactivity from [1-<sup>14</sup>C]acetate (cpm mg<sup>-1</sup> of dry weight) into the three major lipid classes [4-demethylsterols, triacylglycerols (TAG) and phospholipids (PL)] of *Rhizophagus irregularis* grown in the FC of bi-compartmental Petri dish, during 6 weeks in the absence (control) or in the presence of anthracene and benzo[a]pyrene (B[a]P), after 72h of incubation with [1-<sup>14</sup>C]acetate. Data are presented as means. Different letters indicate significant differences between the control and PAH treatment, as determined by ANOVA followed by a multiple range test (LSD) (p≤0.1).

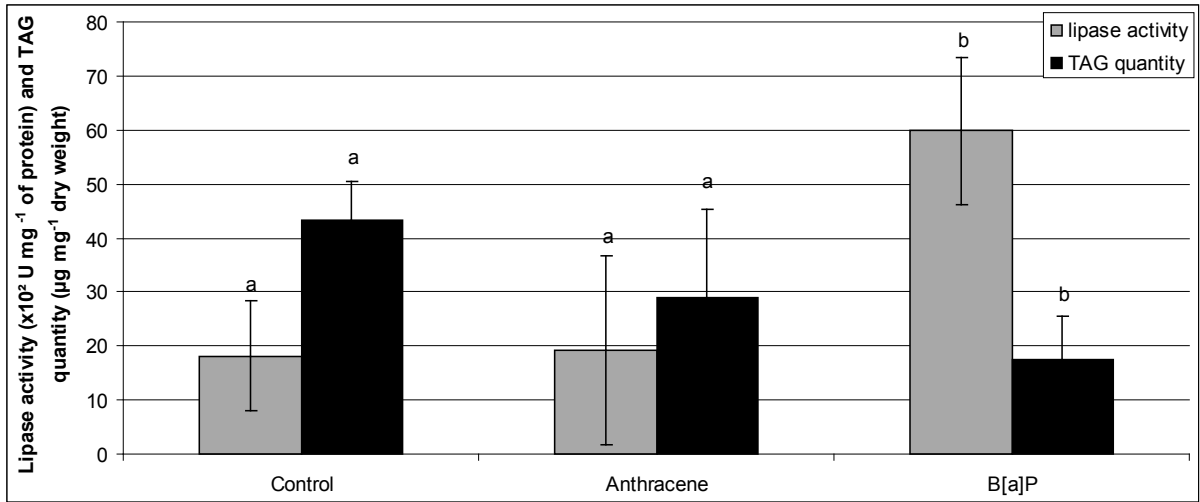


Fig. 3. Triacylglycerol (TAG) contents ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  of dry weight) and lipase activity ( $\times 10^2 \text{ U mg}^{-1}$  of protein) of *Rhizophagus irregularis* grown in the FC of bi-compartmental Petri dish, during 6 weeks in the absence (control) or in the presence of anthracene (ANT) and benzo[a]pyrene (B[a]P). Data are presented as means  $\pm$  SD. Different letters indicate significant differences between the control and PAH treatment, as determined by ANOVA followed by a multiple range test (LSD) ( $p \leq 0.05$ ).

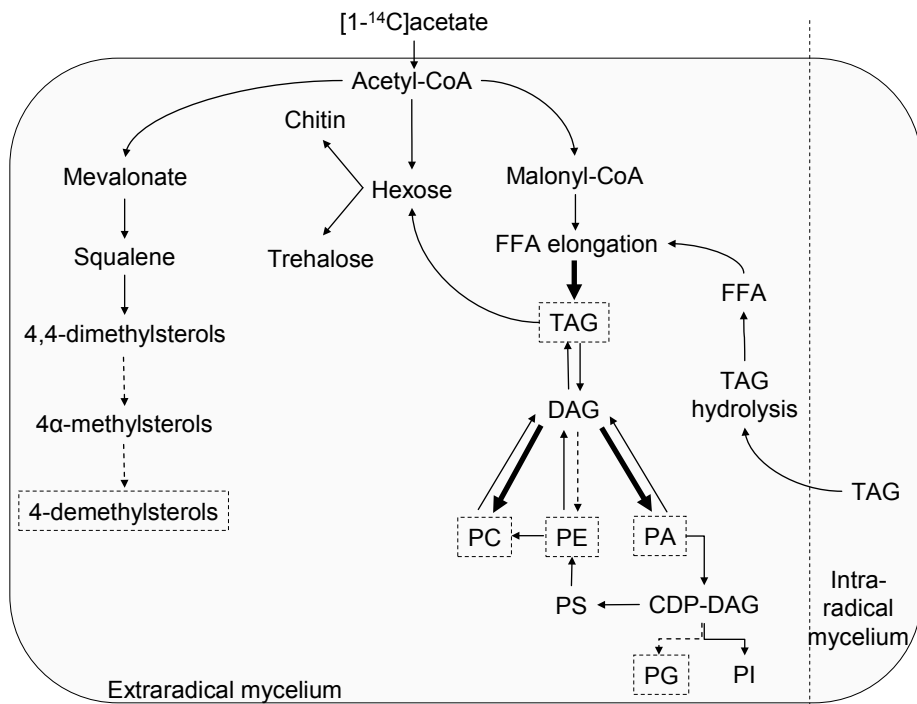


Fig. 4. Scheme summarizing PAH impact on the lipid biosynthesis in *Rhizophagus irregularis* extraradical mycelium

- ▶ : decrease in the incorporation of radioactivity from  $[1-^{14}\text{C}]$ acetate
- ▶ : increase in the incorporation of radioactivity from  $[1-^{14}\text{C}]$ acetate
- ▭ : decrease in quantity

CDP-DAG: cytidine-diacylglycerol; DAG: diacylglycerol; FFA: free fatty acids; PA: acid phosphatidic; PC: phosphatidylcholine; PE: phosphatidylethanolamine; PG: phosphatidylglycerol; PI: phosphatidylinositol, PL: phospholipids; TAG: triacylglycerol.

## Principaux résultats

Nos résultats montrent que la présence des HAPs, malgré un taux de prélèvement de l'acétate [ $1-^{14}\text{C}$ ] identique à celui du témoin, diminue l'incorporation de l'acétate radiomarqué dans les lipides totaux. Cela suggère une réorientation du flux d'acétate vers d'autres voies métaboliques, comme celle des glucides par exemple, au détriment de la voie de biosynthèse des lipides. En effet, nous avons constaté que la biosynthèse des principales classes lipidiques (stérols, PL, TAG) est affectée chez *Rhizophagus irregularis* cultivé dans un milieu contenant des HAPs:

### 1- Les lipides membranaires

#### a. Les stérols

Une chute de l'incorporation de l'acétate [ $1-^{14}\text{C}$ ] dans les stérols de fin de chaîne, les 4-déméthylstérols, a été mise en évidence chez le CMA se développant en présence d'HAPs, expliquant ainsi la diminution de la quantité des stérols de fin de chaîne détectée par Debiane et al. (2011). De même cette incorporation de l'acétate radiomarqué diminue dans l'un des précurseurs des stérols, les 4 $\alpha$ -méthylstérols mais pas dans les autres, le squalène et le 4,4-diméthylstérols, indiquant un ralentissement de la voie de biosynthèse des stérols dans le mycélium extra-racinaire de *Rhizophagus irregularis* en aval des 4,4-diméthylstérols. Ceci pourrait être à l'origine de la toxicité des HAPs observée au niveau du développement fongique de *Glomus irregulare* DAOM 197198 décrite par Debiane et al. (2011).

#### b. Les PL

Des diminutions concomitantes entre l'incorporation de l'acétate marqué dans les PL totaux et la teneur totale de ces composés ont été observées dans le mycélium extra-racinaire du CMA cultivé en présence d'HAPs. Pour la PG, un ralentissement de sa biosynthèse a été observé parallèlement à une chute de sa teneur dans le mycélium extra-racinaire du CMA.

En revanche, alors que l'incorporation de l'acétate [ $1-^{14}\text{C}$ ] dans le mélange (PC+PS) (non séparés dans nos conditions expérimentales) augmente, la quantité de PC (PL majoritaire chez *Rhizophagus irregularis*) diminue en présence du B[a]P. L'hypothèse d'une activation de la voie de biosynthèse de la PC et éventuellement de la PS pourrait être avancée, ceci afin de compenser la chute de la teneur de la PC, résultant elle-même de la peroxydation lipidique causée par le stress oxydant induit par les HAPs chez le CMA, comme rapporté par Debiane et al. (2011).

## 2. Les lipides de réserve : les TAG

Alors qu'une augmentation de l'incorporation de l'acétate radiomarqué dans les TAG est mesurée, suggérant une activation de leur voie de biosynthèse, leur quantité chute quand le mycélium extra-racinaire se développe sur un milieu contenant du B[a]P. D'ailleurs, ce résultat est en accord avec l'induction de l'activité des lipases, démontrant une hydrolyse accrue des TAG lorsque le CMA se développe en contact avec le B[a]P.

*En résumé, l'ensemble des résultats obtenus lors de cette première expérience montre des perturbations dans les voies de biosynthèse des différentes classes lipidiques, notamment les stérols et les PL (lipides membranaires) ainsi que les TAG (lipides de réserve) dans le mycélium extra-racinaire du CMA cultivé en présence d'HAPs, en particulier le B[a]P. Le ralentissement de la biosynthèse des stérols, mis en évidence par la présente étude, pourrait expliquer non seulement la chute de la teneur des stérols de fin de chaîne mais également l'inhibition du développement de *Rhizophagus irregularis* décrits par Debiane et al. (2011). De même, nos résultats montrent des diminutions concomitantes entre l'incorporation de l'acétate marqué dans les PL totaux et leur teneur totale dans le CMA. Cependant et de manière surprenante, une incorporation supérieure d'acétate a été détectée dans la PC, alors que la quantité de ce PL diminue, suggérant une activation de sa biosynthèse probablement dans le but de compenser sa chute résultant de la peroxydation lipidique.*

*D'autre part, l'activation de la biosynthèse des TAG parallèlement à leur dégradation accrue, mise en évidence par la diminution de leur teneur et l'induction des lipases, semble permettre au CMA de lutter contre le stress oxydant induit par le B[a]P.*

# *Article 2*

Polyaromatic hydrocarbons impair phosphorus  
transport by arbuscular mycorrhizal fungi

M. Calonne, J. Fontaine, B. Tisserant, H. Dupré de Boulois, A.  
Grandmougin-Ferjani, S. Declerck, A. Lounès-Hadj Saharaoui

*Soumis dans Journal of Experimental Botany*



## Présentation de l'article 2

---

### Introduction - Objectif

Comme nous venons de le voir d'après les résultats présentés dans l'article 1, les effets délétères des HAPs sur le développement du CMA résultent d'un ralentissement de la biosynthèse des lipides membranaires (les stérols et les PL). En effet, cette perturbation du métabolisme lipidique conduit à une altération des constituants membranaires lipidiques mise en évidence à la fois par la chute des teneurs des stérols de fin de chaîne (les 4-déméthylstérols) et des PL, notamment la PC mais également par une accumulation du MDA (marqueur de peroxydation des lipides) (Debiane et al., 2011). Ces dommages au niveau membranaire peuvent avoir des conséquences diverses au niveau du fonctionnement cellulaire dont une possible perturbation de la fluidité membranaire et un dysfonctionnement de certaines enzymes associées aux membranes. Il est d'ailleurs connu que sur les membranes, certaines protéines, tels que les transporteurs, interagissent de manière très spécifique avec un petit nombre de molécules lipidiques, ces lipides étant souvent essentiels pour l'activité de la protéine et agissant tel un co-facteur (Simon-Plas et al., 2011).

Nous nous sommes alors demandés quelles pourraient être les conséquences de ces altérations membranaires causées par la présence des HAPs sur l'un des bénéfices essentiels de la symbiose mycorhizienne à savoir le transport du P par le CMA du milieu de culture vers la racine.

La biodisponibilité limitée du P, élément indispensable à la croissance des plantes, (revue de Smith et al., 2011), les a conduit à mettre en place des stratégies leur facilitant son acquisition (Marschner, 1995; revue de Van Aarle et Olsson, 2008). La stratégie la plus utilisée par les plantes est l'association avec un CMA (revue de Smith et al., 2011) leur transmettant le P en échange de carbone (Bago et al., 2003; Pfeffer et al., 2004).

Le P est tout d'abord prélevé par les hyphes extra-racinaires du CMA *via* des symports Pi/H<sup>+</sup>. Trois transporteurs dans le mycélium extra-racinaire sont connus: GvPT, GiPT et GmosPT identifiés chez *Glomus versiforme*, *Glomus intraradices* et *Glomus mosseae* respectivement (Harrison et Van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza et al., 2001; Benedetto et al., 2005). Puis le P est rapidement condensé en grandes quantités de granules de poly-P (Ezawa et al., 2004). Les poly-P seraient très majoritairement transportés des hyphes extra-



racinaires vers les hyphes intra-racinaires par un système de vacuoles tubulaires reliées entre elles, tandis qu'une autre partie du transport aurait lieu *via* le courant cytoplasmique (Uetake et al., 2002; revue de Van Aarle et Olsson, 2008). Une fois à proximité des arbuscules, les poly-P sont hydrolysés par des phosphatases afin de transférer le P dans le compartiment apoplastique péri-arbusculaire. Il semblerait qu'un transporteur de P, GmosPT, identifié chez *Glomus mosseae*, soit impliqué dans ce mécanisme (Balestrini et al., 2007). Enfin, le P serait prélevé par les cellules végétales *via* des transporteurs, tel que le transporteur PT4 codé par le gène *MtPT4* identifié chez *Medicago truncatula* dans les cellules racinaires colonisées par le CMA (Javot et al., 2007b)

Même si le mécanisme du transport du P du CMA vers les racines est relativement bien connu, l'impact des polluants du sol sur cette fonction écosystémique importante est très peu documenté. Les quelques travaux à ce sujet ont montré l'altération du transport du P en présence de fongicides, le bénomyl et le fenpropimorphe (Larsen et al., 1996; Zocco et al., 2011). Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur l'impact des HAPs sur le transport par le P par le CMA vers les racines.

Ainsi l'objectif de ce deuxième article consiste en l'étude du transport du P par le CMA *Rhizophagus irregularis* cultivé en présence de l'anthracène et du B[a]P vers les racines de chicorée. Pour ce faire, ont été examinés (1) le prélèvement du <sup>33</sup>P par le CMA et son transport du mycélium extra-racinaire vers les racines, (2) l'expression de deux gènes (*GiPT* codant pour un transporteur de P et *GiALP* codant pour une enzyme phosphatase alcaline) impliqués dans le transport du P et (3) les activités enzymatiques phosphatases acides et alcalines. Les HAPs ont été appliqués dans le milieu de culture sous forme de molécules, pures ou en mélange, afin de se rapprocher des conditions réelles des sols pollués contenant généralement un mélange de polluants.

1           **Polyaromatic hydrocarbons impair phosphorus**  
2           **transport by arbuscular mycorrhizal fungi**

3

4           M. Calonne<sup>1</sup>, J. Fontaine<sup>1</sup>, B. Tisserant<sup>1</sup>, H. Dupré de Boulois<sup>2</sup>, A. Grandmougin-  
5           Ferjani<sup>1</sup>, S. Declerck<sup>2</sup>, A. Lounès-Hadj Sahraoui<sup>1\*</sup>

6

7           1. Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, Université du Littoral Côte d'Opale, Unité de Chimie  
8           Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV), F-62228 Calais, France

9           2. Université catholique de Louvain, Earth and Life Institute, Mycology, Croix du Sud 2 bte L7.05.06,  
10           1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

11           \* corresponding author. *E-mail*: lounes@univ-littoral.fr. *Tel*: +33 3 21 46 36 58

12

13

14           Number of tables: 3

15           Number of figures: 4

16

17           Total word count: 6449

## 18 Abstract

19           Nowadays, phytoremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)  
20 by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is a innovative method which offers the  
21 advantage of being cost-effectiveness and ecological. Although the PAHs impact was  
22 demonstrated, no works were led on the PAHs impact on the nutrient exchange  
23 between the two beneficial symbiotic partners. The present study thus aims to  
24 investigate the AMF ability to transport phosphorus (P) to the host roots in the  
25 presence of the low molecular weight PAH: anthracene alone, and the high molecular  
26 weight PAH: benzo[a]pyrene (B[a]P) alone and the combination of anthracene and  
27 B[a]P, in bi-compartmental Petri dishes cultures. The alkaline and acid phosphatase  
28 activities in the mycorrhizal chicory roots as well as in the AMF and the expression  
29 of two genes involved in P transport in *Rhizophagus irregularis* extraradical  
30 mycelium (*GiPT*, encoding a P transporter and *GiALP*, encoding an alkaline  
31 phosphatase) were studied.

32           Firstly, a mycorrhizal protection against the PAHs phytotoxicity was  
33 evidenced even the fungal growth was affected by the PAHs, in particular, in the  
34 presence of the combination of both PAHs. Secondly, the results demonstrated an  
35 alteration in the P transport by the AMF from the culture medium to the roots, as  
36 highlighted by the decrease in <sup>33</sup>P activity recovered in the host roots and the  
37 decrease in acid phosphatase activity in the mycorrhizal roots. Moreover, our  
38 findings showed that the fungal alkaline phosphatase activity as well as the *GiPT* and  
39 *GiALP* gene expression remained constant under PAHs treatments when compared to  
40 the control in the extraradical AMF. Finally, PAHs impact on even P uptake by the  
41 AMF from the medium or P translocation to the intra-radical hyphae or P transfer to  
42 the roots is discussed.

43

44

45 Keywords: Polyaromatic hydrocarbons, arbuscular mycorrhizal fungi, phosphorus  
46 transport, phosphatases, *GiPT* and *GiALP* gene expression

## 47 1. Introduction

48

49 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are of major environment and  
50 human health concern due to their widespread occurrence, toxicity and persistence in  
51 ecosystems, particularly in soils. So far, several management and remediation  
52 methods have been proposed and tested (Gan *et al.*, 2009), among which  
53 phytoremediation assisted by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (Leyval *et al.*,  
54 2002). This approach may represent a cost-effective and environmental friendly  
55 alternative. Indeed, an increased dissipation of PAHs was reported with mycorrhizal  
56 plants (Liu *et al.*, 2004; Rabie, 2005; Cheung *et al.*, 2008; Liu et Dalpé 2009; Gao *et*  
57 *al.*, 2011) as well as an enhanced tolerance of the plants against these pollutants  
58 (Joner and Leyval, 2001, 2003; Debiane *et al.*, 2008, 2009). Debiane *et al.* (2008,  
59 2009) demonstrated that root colonization by AMF may alleviate the oxidative stress  
60 caused by the anthracene and benzo[a]pyrene (B[a]P). These authors demonstrated  
61 that cell membrane damage (evaluated via malondialdehyde (MDA), a lipid  
62 peroxidation biomarker) and DNA oxidative damage (evaluated through 8-hydroxy-  
63 2'-deoxyguanosine, a DNA alteration biomarker) were lower in mycorrhizal roots as  
64 compared to non-mycorrhizal ones. An induction of the antioxidant enzyme activity  
65 superoxide dismutase was revealed in the mycorrhizal roots grown in the presence of  
66 anthracene and B[a]P (Debiane *et al.*, 2008, 2009).

67 Nowadays, several studies have reported the detrimental impact of PAHs on  
68 AMF spore germination (Alarcón *et al.*, 2006; Verdin *et al.*, 2006; Franco-Ramírez  
69 *et al.*, 2007), root colonization (Leyval and Binet, 1998; Joner and Leyval, 2001;  
70 Gaspar *et al.*, 2002) and extraradical mycelium development (Debiane *et al.*, 2008,  
71 2009, 2011). However, no study mentioned the impact of PAHs on the uptake of  
72 nutrients (i.e. phosphorus (P)) by AMF, their subsequent translocation within the  
73 hyphae and transfer from fungal cell to plant cell.

74 Although P is critical for plant growth, it's availability to plants is limited  
75 (Smith *et al.*, 2011). While many soils have a high organic or inorganic P content  
76 (Sanyal and De Datta, 1991), only a small proportion (generally <1%) is immediately  
77 available to plants (Richardson *et al.*, 2009). Plants have thus evolved a range of  
78 strategies to increase either P uptake capacity or P availability in the soil (Marschner,  
79 1995; Van Aarle and Olsson, 2008). The most widespread strategy to increase P  
80 uptake is the association of plants to AMF (Smith *et al.*, 2011). In this symbiotic

81 association, the plant provides hydrocarbons to the AMF, in exchange of which it  
82 receives essential mineral nutrients, such as P, taken up from the soil by the  
83 extraradical mycelium of the fungus (Bago *et al.*, 2003; Pfeffer *et al.*, 2004). In  
84 extraradical hyphae, P enters the fungal cytoplasm via high-affinity Pi:H<sup>+</sup>  
85 symporters, which are homologous to the yeast *Saccharomyces cerevisiae* PHO84  
86 and *Neurospora crassa* PHO-5 Pi transporters and to the plant major family Pht1 Pi  
87 transporters (Bun-Ya *et al.*, 1991; Harrison and Van Buuren 1995; Pao *et al.* 1998;  
88 Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001; Benedetto *et al.*, 2005; Javot *et al.*, 2007a).  
89 Phosphorus is then rapidly condensed into polyphosphate granules (poly-P) (Ezawa  
90 *et al.*, 2004). In intraradical hyphae, poly-P are hydrolyzed by phosphatases in order  
91 to release P to the plant. The P is finally transferred to the peri-arbuscular apoplastic  
92 compartment, probably via a fungal phosphate transporter, as GmosPT exclusively  
93 found in arbuscular-containing cells (Balestrini *et al.*, 2007), and removed from the  
94 peri-apoplastic compartment by plant P transporter (Balestrini *et al.*, 2007; Javot *et*  
95 *al.*, 2007a, b).

96 At molecular level, three P transporters are known in the AMF: *GvPT*, *GiPT*  
97 and *GmosPT* identified respectively in *Rhizophagus versiforme*, *R. irregularis* and  
98 *Funneliformis mosseae* (Harrison and Van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza *et*  
99 *al.*, 2001; Benedetto *et al.*, 2005). Whereas these genes are all expressed in the AMF  
100 extraradical hyphae, *GmosPT* shows also a significant expression in intraradical  
101 hyphae (Benedetto *et al.*, 2005; Javot *et al.*, 2007a). Moreover, two genes encoding  
102 alkaline phosphatases (*GiALP* and *GmALP*) in *R. irregularis* and *Gigaspora*  
103 *margarita*, respectively, were identified both in intraradical and extraradical hyphae.  
104 These genes may have a role in the P translocation to the host plants (Aono *et al.*,  
105 2004).

106 Even if the knowledge on P transport by AMF to the roots is in progress, the  
107 impact of various organic molecules (e.g. fungicides) on this essential physiological  
108 activity is poorly documented. The radiolabelled <sup>32</sup>P transport inhibition from  
109 *Rhizophagus caledonius* hyphae to *Cucumis sativus* L. roots was reported in the  
110 presence of the benomyl fungicide (Larsen *et al.*, 1996). More recently, it was  
111 observed that the capacity of *Rhizophagus sp.* MUCL 43204 to take up and  
112 translocate labelled <sup>33</sup>P to *Medicago truncatula* roots was inhibited in the presence of  
113 the sterol biosynthesis inhibitor fenpropimorph (Zocco *et al.*, 2011).

114 Nevertheless, no studies described the impact of persistent organic pollutants,  
115 such as PAHs, on P transport by the AMF. Here, we aimed to investigate, under strict  
116 *in vitro* root organ culture (ROC) conditions, the ability of *R. irregularis* DAOM  
117 197198 (MUCL 43194) to take up the radiolabelled  $^{33}\text{P}$  from the medium and to  
118 translocate this element to chicory roots in the presence of PAHs (anthracene,  
119 benzo[a]pyrene (B[a]P) and the combination of both PAHs. In addition, the alkaline  
120 and acid phosphatase activities in the mycorrhizal chicory roots as well as in  
121 *Rhizophagus irregularis* extraradical mycelium and the expression of two genes  
122 involved in P transport in *R. irregularis* extraradical mycelium (*GiPT*, encoding a P  
123 transporter and *GiALP*, encoding an alkaline phosphatase) were studied.

124

## 125 2. Materials and methods

126

### 127 2.1. Biological material

128 All the experiments were conducted with monoxenic cultures of Ri T-DNA-  
129 transformed chicory roots (*Cichorium intybus* L.) (Fontaine *et al.*, 2004) associated  
130 to the AMF *R. irregularis* DAOM 197198 (MUCL 43194) (Schüßler and Walker,  
131 2010) or with non-colonized chicory roots.

132

### 133 2.2. Anthracene and B[a]P preparation

134

135 Anthracene and B[a]P used as pure molecules or as a mixture were dispersed  
136 in a flask containing sterile gelatine [(gelatine (0.5%) and NaCl (0.9%)] thanks to  
137 ultrasonic sound during 5 min at ambient temperature. PAHs were added in the  
138 minimal (M) medium (Bécard and Fortin, 1988) [solidified with Phytigel 0.25%  
139 (p/v) (Sigma, St Louis, MO, USA)] autoclaved at 121°C during 20 min, to obtain  
140 280  $\mu\text{M}$  final concentrations of anthracene, B[a]P and the combination of both PAHs  
141 (50/50; v/v).

142

### 143 2.3. Experimental procedures

144

#### 145 2.3.1. Determination of the PAHs impact on the root biomass and AMF growth

146 The culture medium containing or not PAHs was distributed in mono-  
147 compartmented Petri dishes of 9 cm diameter (25 ml/Petri dish). Cultures were

148 started from a standardized 1.5 cm<sup>2</sup> piece of gel containing root inoculum of a 2-  
149 month-old monoxenic cultures of Ri T-DNA transformed chicory roots, colonized or  
150 not by *R. irregularis*, which was placed in the middle of the Petri dishes. The Petri  
151 dishes were incubated at 27°C in the dark in an inverted position during 9 weeks.

152 The extraradical hyphal length of *R. irregularis* was measured under a low  
153 power microscope at 10 to 40x magnification using a gridline intersects technique as  
154 described by Declerck *et al.* (2001). Data was processed using the Newman's  
155 formula (1966):  $L = (\Pi * N * A) / (2 * H)$  (L= hyphal length; N= intersection  
156 number; A= gridline surface; H= gridline length sum). Spore number was also  
157 enumerated in each square formed by the gridline and summed over the entire Petri  
158 dish. Five Petri dishes were considered per treatment.

159 Root biomass as well as root colonization were quantified after solubilization  
160 of the medium in 1 vol. of Tris-HCl buffer (50 mM - EDTA 10 mM pH 7.5)  
161 (Nagahashi *et al.*, 1993). The roots from the five Petri dishes were collected by  
162 filtration and rinsed with sterile water. After 24h of lyophilisation, the biomass of the  
163 non-mycorrhizal and mycorrhizal roots was estimated. The mycorrhizal roots from  
164 other five Petri dishes and removed from the solubilised medium was cleared in  
165 KOH 10% for 1h at 70°C and stained with Trypan Blue (Trypan Blue 0.5 g in  
166 32/32/467 of water/glycerol/lactic acid (v/v/v) for 1h at 70°C (Phillips and Hayman,  
167 1970) to quantify the total (%T), arbuscular (%A) and intraradical spores/vesicles  
168 (%V) root colonisations according to the method of McGonigle *et al.* (1990). For  
169 each treatment, three slides containing each 20 stained root fragments were made and  
170 3 sections per root fragment were observed under microscope at 400x magnification.

171

172 2.3.2. Impact of the PAHs on P transport, enzymatic activity in hyphae and gene  
173 expression in roots

174 *R. irregularis* cultures were set up in bi-compartmented Petri dishes (9 cm)  
175 with a watertight plastic wall separating the root compartment (RC) containing the  
176 chicory root associated to the AMF, from the hyphal compartment (HC) in which  
177 only the AMF was allowed to grow (St-Arnaud *et al.* 1996). The RC was filled with  
178 25 ml M medium without PAHs. A standardized 1.5 cm<sup>2</sup> piece of gel containing root  
179 inoculum of a 2-month-old monoxenic cultures of Ri T-DNA transformed chicory  
180 roots colonized by *R. irregularis* was placed on the M medium. After 3 weeks, the  
181 HC was filled with 30 ml of modified M medium without vitamins and sucrose

182 (named M1 medium) and supplemented or not (control) with PAHs. Roots that grew  
183 over the plastic wall in the HC were trimmed and removed. The Petri dishes were  
184 incubated at 27°C in the dark in an inverted position during 6 weeks.

185 After 9 weeks of incubation, the %T, %A and %V root colonizations in the  
186 RC was estimated on five Petri dishes per treatment. Moreover, the number of  
187 Branched Absorbing Structure (BAS) (Bago *et al.*, 1998) formed in the HC of the bi-  
188 compartmented Petri dishes and the total number of hyphae crossing the plastic wall  
189 separating the RC from the HC were measured under a low power microscope at 10  
190 to 40x magnification.

191

192 – <sup>33</sup>P transport

193 The AMF transport of radiolabelled <sup>33</sup>P was evaluated following the method  
194 described by Zocco *et al.* (2011). Eight bi-compartmented Petri dishes were  
195 considered per treatment (anthracene, B[a]P and the combination of both). After 6  
196 weeks of growth in the HC, a source of <sup>33</sup>P was added to this compartment. The  
197 source of <sup>33</sup>P was orthophosphate in diluted hydrochloric acid (<0.1 M) as supplied  
198 by PerkinElmer (Zaventem, Belgium). The source of <sup>33</sup>P was filter-sterilized  
199 (Acrodisc Syringe filters, PALL Corporation, Ann Arbor, MI, USA) and 200 µl was  
200 applied on the surface of M1 medium in the HC of each Petri dish. The final activity  
201 in the HC at the start of the experiment was 1666.7 Bq ml<sup>-1</sup> of M1 medium. A  
202 formaldehyde-control treatment was included by addition of formaldehyde (2%; v/v),  
203 on the surface of M1 medium in the HC, 2 days before the <sup>33</sup>P addition (Dupré de  
204 Boulois *et al.*, 2005). Five replicates were considered for this control. After 72h of  
205 incubation in the presence of <sup>33</sup>P, roots were removed from the RC and gently  
206 washed-clean from the M medium. The M medium in the RC and M1 medium in the  
207 HC (containing the AMF) were also recovered. <sup>33</sup>P transport was measured by  
208 counting the activity in the RC and HC medium (on a piece of gel of 2 cm<sup>3</sup>,  
209 corresponding to 2 ml medium, solubilized in the same volume of citrate buffer (10  
210 mM, pH 6) (Doner and Bécard, 1991)) and in the chicory roots.

211 Root were first digested in perchloric acid/nitric acid (70/30; v/v) as described  
212 by Becker *et al.* (1992).

213 An aliquot of 10 ml of liquid scintillation cocktail was added to the samples  
214 (Ultima GoldTM, Packard BioScience, Groningen, Netherlands). <sup>33</sup>P activity in each



215 sample was then counted on a Packard TR2500 Liquid Scintillation Analyser  
216 (Packard Instruments, Meriden, CT, USA).

217

218 – Alkaline and acid phosphatases assays

219 Forty bi-compartmented Petri dishes per treatment (anthracene, B[a]P and the  
220 combination of both) were used to study the impact of anthracene, B[a]P and the  
221 combination of both on the alkaline and acid phosphatases activities. The mediums  
222 containing *R. irregularis* (about 25 mg) in the HC and the mycorrhizal roots (about  
223 100 mg) in the RC of the bi-compartmented Petri dishes were dissolved in 1 vol. of  
224 Tris-HCl (50 mM - EDTA 10 mM pH 7.5). The biological material was grinded in  
225 liquid N<sub>2</sub> and extracted in 1 ml of sucrose-triton extraction buffer (STEB) containing  
226 20 mM Tris-HCl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM β-  
227 mercaptoethanol, 10% sucrose and 0.1% Triton X-100, at pH 8.0 (Sen and Hepper,  
228 1986). After centrifugation at 16000 rpm during 20 min at 4°C, the upper phase was  
229 recovered and stored at -80°C before alkaline assay on extraradical *R. irregularis* and  
230 AMF-colonized roots and acid phosphatase assay in AMF-colonized roots and  
231 protein content determination.

232 Phosphatase activities were assayed using the *p*-nitrophenylphosphate as the  
233 substrate (Wako LabAssay™ ALP, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan).  
234 Carbonate buffer (0.1 M, pH 8.8) was prepared as described by Delory and King  
235 (1945) to measure alkaline phosphatase activity and sodium acetate buffer (0.1 M,  
236 pH 5.5) was prepared as described by Green (1933) to measure acid phosphatase  
237 activity. Supernatants recovered previously were added to 400 µl of each buffer  
238 containing the *p*-nitrophenylphosphate (6.7 mM) and incubated during 15 min in a  
239 water bath at 37°C. The enzymatic reaction was stopped by adding 320 µl of NaOH  
240 (0.2 M) to each sample. Activities were quantified by comparing the absorption at  
241 405 nm to a standard curve of diluted *p*-nitrophenol solutions and NaOH. They were  
242 expressed in U/mg of proteins. Total proteins concentrations were determined in  
243 supernatants using the Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification  
244 (Sigma–Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA).

245

246

247

248 - P transporter (*GiPT*) and alkaline phosphatase (*GiALP*) gene expression  
249 analysis

250 Fifty bi-compartmented Petri dishes per treatment were used to investigate  
251 the effect of anthracene, B[a]P and the combination of both on the P transporter  
252 (*GiPT*) and an alkaline phosphatase (*GiALP*) gene expression in *R. irregularis*. The  
253 medium containing the AMF (about 100 mg) in the HC was dissolved in 1 vol. of  
254 Tris-HCl (50 mM - EDTA 10 mM pH 7.5). RNA extraction was conducted on 3  
255 replicates for each treatment in two independent experiments for anthracene and the  
256 combination of anthracene and B[a]P and three independent experiments for B[a]P.  
257 The biological material was grinded with liquid N<sub>2</sub> and using "RNeasy Plant Mini  
258 Kit" (Qiagen, Hilden, Germany), according to manufacturer's instructions, including  
259 a treatment with a deoxyribonuclease I enzyme in order to eliminate residual DNA.  
260 RNA was routinely quantified by spectrophotometry. cDNA corresponding to isolated  
261 RNA were then synthesized using "High Capacity cDNA Reverse transcription Kit"  
262 (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the  
263 fabricant's protocol. The enzymatic reaction performed on 1 µg of RNA which  
264 allows the cDNA synthesis double-strand was induced in a PTC-200 thermocycler  
265 (Peltier Thermal Cycler).

266 A real-time PCR was done in 96 well plates on a 7300 Real Time PCR  
267 system apparatus (Applied Biosystems), in order to determine gene transcription  
268 level. Each real-time PCR individual reaction was conducted in a total volume of 25  
269 µl containing 12.5 µl of Power Syber Green Master Mix (Applied Biosystems), 400  
270 nM of each forward or reverse primer (1 µl), 5.5 µl H<sub>2</sub>O and 25 ng of cDNA (5 µl)  
271 from the reverse transcription following the programme: incubation at 95°C during  
272 10 min, followed of 40 cycles each composed with a period at 95°C during 30 sec,  
273 60°C during 45 sec and 72°C during 45 sec, when the fluorescence was measured. A  
274 dissociation curve was done after each run in order to check the absence of non  
275 specific PCR products. Each reaction contained 3 independent technical repetitions  
276 for each treatment (control, anthracene alone, B[a]P alone, as pure molecules and  
277 the (anthracene/B[a]P) mixture), for each independent experiment.

278 The following primers were used to amplify *GiPT*: *Glomus intraradices* *GiPT*  
279 forward (5'-CCG TTC CTG GTT ATT GGG TTA CT-3') and reverse (5'-GGC  
280 AGC ACC CAT GAC AAT AAA-3'), the *Glomus intraradices* *GiALP* forward (5'-

281 TGT CAC GAG CCG TAT CAC TCA-3') and reverse (5'-TTC CAA GAG GAT  
282 AAT CGC CAA TT-3').

283 Transcription levels were normalised using the housekeeping gene *Glomus*  
284 *intraradices* 18S, that forward primer was (5'-GGA ACA ATT GGA GGG CAA  
285 GTC-3') and reverse primer was (5'-CAA CCT ACT AAC CCC GAA ATT CAA C-  
286 3').

287

#### 288 2.4. Statistical analysis

289

290 Hyphal length and number of spores in the HC, root colonization percentage,  
291 <sup>33</sup>P activity in roots and medium of RC and HC, root phosphatase activities and  
292 genes expression were analyzed for the different treatments (anthracene, B[a]P and  
293 the combination of both PAHs (anthracene + B[a]P) and formaldehyde control) by  
294 ANOVA, using Statgraphics release 5.1 (Manugistic, Inc., Rockville, MD, USA).  
295 The method used to discriminate between the means was the LSD test ( $p \leq 0.05$ ).  
296 Levene's test of variance homogeneity was checked before the use of the multiple  
297 comparison procedure. The AMF enzymatic alkaline phosphatase activity was  
298 analyzed by the Mann-Whitney U test ( $p \leq 0.05$ ).

299 Data of root colonization and <sup>33</sup>P percentages were converted to arcsine  
300 values before the analysis of ANOVA and LSD test.

301 The comparative threshold cycle (Ct) method (Rasmussen, 2001) was used to  
302 calculate the *GiPT* and *GiALP* relative expression level.

303

### 304 3. Results

305

#### 306 3.1. PAHs impact on the root biomass and AMF growth

307

308 The dry weight of non-mycorrhizal and mycorrhizal chicory roots was  
309 evaluated after 9 weeks of growth in the absence and in the presence of anthracene,  
310 B[a]P and the combination of both (Fig. 1). Whatever the PAH tested, no significant  
311 difference was noticed between the mycorrhizal and the non-mycorrhizal chicory  
312 root biomass. Interestingly, the biomass of the mycorrhizal roots in presence of  
313 PAHs did not differ from the control roots. This contrasted with the non-mycorrhizal  
314 roots, for which the biomass was significantly decreased by 25.5 and 29.2% in the

315 presence of B[a]P and the combination of both PAHs respectively, as compared to  
316 the control. No effect was observed in the presence of anthracene.

317         The impact of PAHs on the intraradical root development is reported in Table  
318 1. Whatever the PAH, the %T was significantly reduced as compared to the control.  
319 The relative decrease was about 40.7 and 32% in the presence of anthracene and  
320 B[a]P, respectively. The decrease was even more important in the presence of the  
321 combination of both PAHs and was significantly lower as compared to each of PAH  
322 alone. The relative decrease was close to 69% as compared to the control. The %A  
323 and %V were significantly decreased by 77 and 59.5% respectively in the presence  
324 of the combination of both PAHs, as compared to the control whereas no significant  
325 differences were noticed for these parameters between the control and each of the  
326 PAHs alone.

327         The development of the extraradical mycelium of the AMF in the mono-  
328 compartmented Petri dishes is presented in Table 1. The hyphae length was  
329 significantly higher in the control treatment as compared to the PAH treatments. The  
330 relative decrease was about 62, 67 and 72% with anthracene, B[a]P and the  
331 combination of both PAHs, respectively, as compared to the control. The number of  
332 spores produced was also significantly lower as compared to the control (i.e. a  
333 relative decrease of 75, 65 and 85% in the presence of anthracene, B[a]P and the  
334 combination of both, respectively). No significant difference was noticed between  
335 the anthracene, B[a]P and the combination of both PAHs treatments for hyphal  
336 length and number of spores produced. Even the mycelium development was  
337 drastically reduced in the presence of B[a]P, no impact on mycelium morphology  
338 was observed.

339

340 3.2. PAHs impact on the <sup>33</sup>P transport, the enzymatic activities and the *GiPT* and  
341 *GiALP* gene expression

342

343         Whatever the PAH applied in the HC, no differences were noticed in the  
344 colonization of roots in the RC (Table 2). In addition, the number of hyphae crossing  
345 the plastic barrier separating the RC from the HC was similar between the different  
346 treatments. Interestingly, no difference was noticed in the number of BAS, estimated  
347 per cm of hyphae, in the HC (Table 2).

348

### 349 3.2.1. PAHs impact on $^{33}\text{P}$ transport

350 In the absence of PAHs (control), the mean  $^{33}\text{P}$  activity measured in the  
351 chicory roots was close to 32200 Bq which corresponds to 67.7% of the initial  $^{33}\text{P}$   
352 activity in the HC (Table 3). The  $^{33}\text{P}$  activity measured in the roots in presence of  
353 anthracene did not differ from the control, while it decreased significantly in the  
354 B[a]P (by 26%) and the combination of both PAHs (by 24%) treatments respectively,  
355 as compared to the control and corresponded to 47 and 48% of the initial  $^{33}\text{P}$  activity  
356 in the HC in the presence of B[a]P and the combination of both PAHs respectively.  
357 The  $^{33}\text{P}$  activity measured in roots per fungal biomass in the HC remains unchanged  
358 in the presence of anthracene, whereas it decreased significantly in the presence of  
359 B[a]P and the combination of both PAHs (Table 3). When the extraradical fungus  
360 was grown in the HC containing B[a]P or the combination of both PAHs, significant  
361  $^{33}\text{P}$  accumulations by about 2.4 and 2 folds respectively were measured in the RC  
362 medium, when compared to the control. On the other hand, in the medium of the HC,  
363 the recovered  $^{33}\text{P}$  remained unchanged whatever the PAHs contained in the medium.

364

### 365 3.2.2. PAHs impact on the enzymatic phosphatase activities

366 The alkaline phosphatase activity was measured in the extraradical mycelium  
367 of *R. irregularis* grown in the HC (Fig. 2). The enzymatic activity reached 29.3 U  
368  $\text{mg}^{-1}$  of protein in the control. No significant difference was noted in the enzymatic  
369 activity between the control and the treatments having received anthracene, B[a]P  
370 and the combination of both molecules. Similarly, no significant differences were  
371 observed in the alkaline phosphatase activities measured in the chicory roots  
372 whatever the treatment (Fig. 3).

373 The acid phosphatase activity was measured in the chicory roots grown in the  
374 RC (Fig. 3). In the control treatment, the acid phosphatase activity was about 13 U  
375  $\text{mg}^{-1}$  of protein. Whereas the enzymatic activity did not differ in the anthracene  
376 treatment, it was significantly decreased by 39 and 24% in the treatments containing  
377 B[a]P and the combination of anthracene and B[a]P, respectively.

378

### 379 3.2.3. PAHs impact on *GiPT* and *GiALP* gene expression

380 The expression level of *GiPT* and *GiALP* was analyzed in the extraradical  
381 mycelium after 6 weeks exposure to anthracene, B[a]P and the combination of both

382 PAHs (Fig. 4). Whatever the treatment no significant difference was noticed in the  
383 level of expression of these two genes (Fig 4).

384

385

#### 386 4. Discussion

387

388 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons are amongst the most harmful soil  
389 pollutants due to their toxic, carcinogenic and mutagenic effects (Mastrangelo *et al.*,  
390 1996). Vegetation may play an important role in the bioremediation of soils  
391 contaminated with persistent organic chemicals by stimulating the activity of  
392 belowground microorganisms having potential for degradation, detoxification and  
393 immobilisation (Susarla *et al.*, 2002; Pilon-Smits, 2005). Arbuscular mycorrhizal  
394 fungi (AMF) are ubiquitous soil microorganisms forming symbiotic associations with  
395 nearly 80% of plant species. These fungi are considered essential for the survival of  
396 many plants in natural competitive situations and can be important under adverse  
397 soil chemical and physical conditions (Augé, 2001; Hildebrandt *et al.*, 2007;  
398 Campagnac *et al.*, 2008, 2010; Calonne *et al.*, 2012; Porcel *et al.*, 2012), including  
399 PAHs pollution (Verdin *et al.*, 2006; Debiane *et al.*, 2008, 2009, 2012). However, the  
400 knowledge on the relationships between AMF and their hosts in polluted habitats is  
401 limited. This is particularly true for PAHs. Few information is available on the  
402 impact of these organic pollutants on the morpho-anatomy and life cycle of AMF  
403 (Leyval and Binet, 1998; Alarcón *et al.*, 2006; Verdin *et al.*, 2006; Debiane *et al.*,  
404 2008, 2009, 2011). In addition, no study, to our knowledge, has reported on the  
405 impact of PAHs on the transport of essential nutrients (e.g. P). Here we aimed to  
406 study the ability of an AMF (i.e. *R. irregularis* DAOM 197198) grown in contact  
407 with PAHs to take up P from the environment, to translocate it within the  
408 extraradical mycelium and to transfer it from the fungal cell to the plant cell. This  
409 study was conducted under strict *in vitro* ROC conditions to avoid any confounding  
410 effects with unwanted organisms or environmental factors. The alkaline and acid  
411 phosphatase activities in the mycorrhizal chicory roots and in the AMF as well as the  
412 expression of two genes involved in P transport in the extraradical mycelium of *R.*  
413 *irregularis* (i.e. *GiPT* and *GiALP*), were also examined. The two PAHs tested (either  
414 alone or as a combination), anthracene and B[a]P (representative of a low and a high  
415 molecular weight PAH respectively), are both frequently found in polluted soils.

416 Our results showed that PAHs, in particular B[a]P and the combination of  
417 anthracene and B[a]P, affected the biomass of the non-mycorrhized roots.  
418 Interestingly, no impact was observed on the mycorrhized roots suggesting that AMF  
419 may protect, at least partially, roots from these pollutants as earlier reported by  
420 Debiane *et al.* (2008, 2009). These authors assigned this increased protection to an  
421 alleviation of the oxidative stress damages. Surprisingly, the mycorrhizal protection  
422 was observed despite the PAHs impact on the AMF development. Indeed, the total  
423 root colonization was drastically reduced in the presence of the PAHs. This reduction  
424 was particularly marked with the combination of both PAHs. Furthermore, our  
425 results exhibited significant decreases in the percentage of arbuscles and intraradical  
426 spores/vesicles in the presence of the combination of both PAHs, while no significant  
427 effect was observed with both PAHs alone. This suggested a synergistic effect of  
428 both pollutants in combination. Polluted soils being generally composed of a cocktail  
429 of pollutants, their detrimental effects on telluric organisms, as mycorrhizae, could  
430 thus be increased. Even earlier studies reported the effect of PAHs on AMF root  
431 colonisation (Verdin *et al.*, 2006; Debiane *et al.*, 2008, 2009), the impact of the  
432 combination of both PAHs has not been studied previously *in vitro*.

433 The detrimental impact of the PAHs on the total root colonization, was  
434 paralleled with a strong decrease in the extraradical mycelium development. This  
435 indicated an alteration of the AMF growth in the presence of these pollutants. This  
436 decrease in hyphae and spore production in presence of anthracene and B[a]P was  
437 earlier reported by Debiane *et al.* (2008, 2009, 2011) and was attributed to damages  
438 caused in membrane lipid constituents. This was evidenced by a concomitant  
439 decreases in phospholipids and sterol contents as well as MDA increase in the  
440 extraradical mycelium of *R. irregularis* (Debiane *et al.*, 2011). We may speculate  
441 that this disturbance may in turn affect the nutrient uptake and transport across this  
442 fungal membrane. Thus, the detrimental impact of PAHs on the AMF growth and the  
443 arbuscular mycorrhizal symbiosis presumably could result in a decrease in the AMF  
444 capacity to transport mineral nutrients, such as P, from the extraradical mycelium to  
445 the roots.

446 Using bi-compartmented Petri dishes, the transport of P from the HC to the  
447 RC in the untreated control (i.e. extraradical mycelium grown in the absence of  
448 PAHs) as well as in the presence of the different PAHs treatments, was measured  
449 72h after  $^{33}\text{P}$  addition in the HC. The activity of  $^{33}\text{P}$  was detected in the roots of each

450 treatment demonstrating the ability of the AMF to take up, translocate and transfer P  
451 from the HC to the host roots in the RC even in the presence of PAHs. The  
452 translocation of P from the HC to RC occurred mainly through active mechanism  
453 since almost no P translocation (less than 1%) was detected in the formaldehyde  
454 controls. However, a significant decrease in the  $^{33}\text{P}$  activity measured in the roots  
455 was observed when the extraradical mycelium was grown in the presence of B[a]P  
456 and the combination of both PAHs, whereas the mycelium dry weight remained  
457 unchanged in the HC. Thus, considering the  $^{33}\text{P}$  quantity in the roots which decreased  
458 in the presence of B[a]P and the combination of both PAHs, we suggest that these  
459 PAHs can alter even (i) P uptake by the AMF from the medium or (ii) its  
460 translocation to the intraradical mycelium or (iii) its transfer to the roots or the  
461 different steps.

462 On the other hand, our results showed that the alkaline phosphatase activity of  
463 the extraradical mycelium was not altered in the presence of PAHs. It was reported in  
464 the literature that some phosphatases are associated with the vacuoles of *G.*  
465 *intraradices* (Olsson *et al.*, 2002) while others are associated with the hyphal wall  
466 where it is supposed to be involved in P uptake from the soil (Van Aarle and Olsson,  
467 2008). Our result thus suggested that P uptake was not affected by PAHs and  
468 corroborates the result of the *GiALP* expression, a gene encoding an alkaline  
469 phosphatase family in *R. irregularis*. The level of expression of this gene remained  
470 unchanged in the presence of PAHs as compared to the controls. Similarly, the *GiPT*  
471 transcript levels (a gene encoding a P transporter identified in *R. irregularis*  
472 (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001)) did not show any change in level of expression  
473 between the PAHs and control treatments. These results fit with the residual P  
474 activity in the HC and the BAS number per hyphae length which were found to be  
475 similar whatever the PAH applied in the culture. Zocco *et al.* (2008) demonstrated  
476 that the extraradical mycelium network, supporting the BAS, was impacted in the  
477 presence of two sterol biosynthesis inhibitor fungicides (fenpropimorph and  
478 fenhexamid) leading to a decrease in the capacity of the AMF to take up P (Zocco *et*  
479 *al.*, 2011). Moreover, AMF possess not only an active P transport system, via the P  
480 transporters, but also a passive low affinity system for P transport across the  
481 membrane, as those highlighted in *Gigaspora margarita* germ-tubes (Thomson *et al.*,  
482 1990). This passive transport system may possibly not be affected by environmental  
483 disturbances. This could be the reason why the AMF capacity to take up P was not



484 affected by PAHs in our experimental conditions. This hypothesis corroborates the  
485 study of Ezawa et al. (2004). These authors demonstrated that P uptake and  
486 subsequent poly-P biosynthesis in AMF was fast, suggesting that the rate-limiting  
487 step of P delivery is the translocation to the host.

488         After P acquisition by the extraradical hyphae via the P transporters, the  
489 element is translocated from the extraradical hyphae to the intraradical hyphae. Our  
490 results showed that the total number of hyphae crossing the plastic wall separating  
491 the RC from the HC remained unchanged in the presence of PAHs. Nielsen et al.  
492 (2002) reported a logarithmic correlation between transported  $^{32}\text{P}$  from the HC to the  
493 RC and the number of hyphae crossing the barrier. This correlation was further  
494 enhanced if only living hyphae were considered. The number of hyphae crossing the  
495 plastic wall remaining constant, it can thus be hypothesized that  $^{33}\text{P}$  translocation  
496 from the HC to the intraradical hyphae was not affected by the PAHs, even if it will  
497 be interesting to determine the number of active crossing hyphae by assessing the  
498 succinate dehydrogenase activity for instance.

499         Once in the intraradical hyphae, poly-P are hydrolyzed by phosphatases,  
500 which results in P ions released into the periarbuscular space (Ezawa et al., 2001). In  
501 the current work, the acid phosphatase activities in mycorrhizal roots decreased in  
502 the presence of B[a]P and the combination of both PAHs as compared to the control,  
503 suggesting that these pollutants affected these enzymatic activities. According to our  
504 results, it seems that this depletion concerns only the enzymatic activities in  
505 intraradical hyphae but not the root enzymatic activities, because the roots were  
506 grown on a PAH-free medium in the RC. The location of acid phosphatases in the  
507 intraradical mycelium suggests their involvement in the P transfer to the plant (Van  
508 Aarle and Olsson, 2008). Indeed, Ezawa *et al.* (2001) reported that acid phosphatases  
509 could be involved in the hydrolysis of vacuolar poly-P in intraradical hyphae upon  
510 which the inorganic P is released into the apoplast of the plant-fungus interface.  
511 Since the hydrolysis of poly-P is linked to the acid phosphatase activity, a high P  
512 transfer from AMF to the plant could be related to a high acid phosphatase activity in  
513 the intraradical mycelium (Van Aarle and Olsson, 2008) and *vice-versa*. The  
514 decrease in acid phosphatase activity, which takes place before the P transfer in the  
515 plant-fungus interface corroborates the  $^{33}\text{P}$  content in the root being reduced in the  
516 presence of PAHs because less poly-P could be hydrolyzed and thus less P could be  
517 available to the transfer. This result is also in accordance with the  $^{33}\text{P}$  accumulation

518 observed in the medium containing the AMF in the RC. The poly-P could be less  
519 hydrolyzed and thus accumulate in hyphae. Taken together, these results suggest that  
520 the decrease in intraradical mycelium acid phosphatase activity resulted in a poly-P  
521 accumulation in hyphae, when the extraradical fungus developed in the presence of  
522 B[a]P in the HC. On the other hand, the alkaline phosphatase activity in the roots did  
523 not seem to be correlated with the P transfer decrease, which is in line with the  
524 findings reported by Van Aarle *et al.* (2002) who observed no such correlation  
525 between the proportion of alkaline phosphatase active intraradical mycelium,  
526 arbuscules of *Gigaspora margarita* and the shoot P content of *Allium cepa* in P-  
527 deprived conditions. Moreover, using an alkaline phosphatase inhibitor, i.e.  
528 beryllium, the arbuscular alkaline phosphatase did not hydrolyse poly-P, but their  
529 best substrates were glucose-6-P and trehalose-6-P, suggesting that these enzymes  
530 may be involved in the metabolism of these sugar phosphates (Ezawa *et al.*, 1999)  
531 and not in poly-P hydrolysis.

532 It is worth to notice that acid phosphatase activity was affected in the  
533 intraradical mycelium of mycorrhizal roots whereas only the extraradical mycelium  
534 was grown in the presence of PAHs. This can fit with earlier findings reported by  
535 Verdin *et al.* (2006) who observed that a fraction of the dissipated PAHs by the  
536 mycorrhizal chicory roots was bioaccumulated in the lipid bodies in the AMF  
537 mycelium. Furthermore, Bago *et al.* (2002) demonstrated active movement of lipid  
538 bodies in the thicker runner hyphae of *G. intraradices* extraradical mycelium, in or  
539 against the cytoplasmic streaming and the fastest lipid movement was calculated as  
540 being  $4 \mu\text{m sec}^{-1}$ , i.e. 34.5 cm by day. Recently, using compartmental rhizoboxes, it  
541 was demonstrated that PAHs were transferred to the mycorrhizal roots, after uptake  
542 by external mycelium (Gao *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). Therefore, it could be  
543 suggested that lipid bodies accumulating PAHs could move to the intraradical  
544 mycelium hyphae and affect the intraradical fungal activities, such as the acid  
545 phosphatase activity.

546 Finally, the absence of changes in total root colonization and percentage of  
547 arbuscules in the bi-compartmented systems suggested that the PAHs had no indirect  
548 impact on the intraradical fungal development via the extraradical mycelium.  
549 However, although the total root colonization and percentage arbuscules were not  
550 affected in the RC by the extraradical mycelium PAHs exposure in the HC, we  
551 cannot exclude that the decrease in P translocation to the roots could be a

552 consequence of arbuscules inactivation. Indeed, Zocco *et al.* (2011) observed a  
553 discrepancy between the AMF colonization of *Medicago truncatula* and the fungal  
554 rRNA 28S expression in mycorrhizal roots and therefore hypothesized that  
555 intraradical fungal structures were not metabolically active when the extraradical  
556 AMF was grown in the presence of the SBI fungicide fenpropimorph. In order to  
557 confirm this assumption, the monitoring of fungal 28S transcript levels in the  
558 mycorrhizal roots could be investigated in the future. Moreover, the monitoring of  
559 *MtPT4* transcript levels, encoding a P transporter located in the peri-arbuscular  
560 membrane in *M. truncatula*, essential for the acquisition of P delivered by the AMF  
561 and for the correct development of the fungus inside the roots (Javot *et al.*, 2007b),  
562 could be analyzed in order to confirm the decrease in P transferred to the plant-  
563 fungal interface.

564

565 In conclusion, our findings reported the impact of two PAHs (anthracene and  
566 B[a]P), tested individually or in combination, on the root biomass, on the fungal  
567 growth and for the first time, on the transport of P by the AMF *R. irregularis* from  
568 the medium to the root cells under strict *in vitro* culture conditions. Firstly, a  
569 mycorrhizal protection against the PAHs phytotoxicity was evidenced even if the  
570 fungal growth was affected by the pollutants. Furthermore, the combination of both  
571 PAHs appeared more toxic than each of the PAH individually due probably to  
572 synergistic effects. Secondly, PAHs affected the P transport from the medium to the  
573 roots. This was evidenced by either the decrease in <sup>33</sup>P quantity transported in the  
574 roots as well as the decrease in acid phosphatase activity in the mycorrhizal roots.  
575 Moreover, the fungal alkaline phosphatase activity as well as the *GiPT* and *GiALP*  
576 gene expression remained constant in the presence and in the absence of PAHs.  
577 These findings suggested that it is not the P uptake by the AMF which is altered but  
578 probably another transport steps. To validate this assumption, it will be interesting in  
579 the future to quantify the <sup>33</sup>P contained in the extraradical AMF grown in the HC.

580 Furthermore, we cannot exclude that another assumption could be issued to  
581 explain the constant expression of *GiPT* and *GiALP* genes in the presence of PAHs.  
582 In our experimental conditions, the AMF was grown in the presence of PAHs during  
583 6 weeks until reaching the spore production phase (which could be considered as a  
584 too-long time to analyse gene expression in response to PAHs exposure). It would be  
585 interesting to examine the PAHs impacts on the *GiALP* and *GiPT* expression earlier

586 (a few hours or days after PAHs exposure) during the early stages of hyphal  
587 elongation. In fact, Maldonado-Mendoza *et al.* (2001) reported that the P status of  
588 the mycorrhizal root can influence P uptake by the extraradical hyphae and *GiPT*  
589 expression. During the first days of hyphal elongation in the presence of PAHs, a  
590 signal could be send to extraradical hyphae, from roots via arbuscules, in order to  
591 activate the P transporter gene (*GiPT*) and the alkaline phosphatase gene (*GiALP*), so  
592 as to sample more P to compensate the deficit. To check this hypothesis, a kinetic of  
593 *GiPT* and *GiALP* expression could be proposed in the future.

594

595 The present study suggested a direct effect of PAHs on the AMF growth as  
596 well as on the physiological and metabolic activities of *R. irregularis* which could  
597 interfere with the establishment of the symbiosis in polluted soils and their  
598 functioning in transport of essential nutrients (i.e. P) to the host plant.

599 Our results further highlighted the potential of ROC, in particular bi-  
600 compartmented systems, as a complementary approach to pot experiment, to study  
601 the mechanisms involved in the AMF functioning (e.g. P transport) in presence of  
602 organic pollutants.

603

604

## 605 5. Acknowledgements

606

607 The authors wish to thank the Syndicat Mixte de la Côte d'Opale (SMCO) for  
608 providing financial support to M. Calonne thesis. The laboratory participates in the  
609 Institut de Recherche en ENvironnement Industriel (IRENI) which is financed by the  
610 Communauté Urbaine de Dunkerque, the Région Nord Pas-de-Calais, the Ministère  
611 de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the CNRS and European Regional  
612 Development Fund (ERDF).

613

614

## 615 6. References

616

617 **Alarcón A, Delgadillo-Martínez J, Franco-Ramírez A, Davies FT, Ferrera-**  
618 **Cerrato R.** 2006. Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore  
619 germination, and phytoremediation potentials of *Gigaspora margarita-Echinochloa*

- 620 *polystachya* symbiosis in benzo[a]pyrene-polluted substrate. *Revista Internacional*  
621 *de Contaminación Ambiental* **22**, 39-47.
- 622 **Aono T, Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ, Saito M.** 2004.  
623 Expression of alkaline phosphatase genes in arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist*  
624 **162**, 525-534.
- 625 **Augé RM.** 2001. Water relations, drought and vesicular–arbuscular mycorrhizal  
626 symbiosis. *Mycorrhiza* **11**, 3-42.
- 627 **Bago B, Azcón-Aguilar C, Goulet A, Piché Y.** 1998. Branched absorbing structures  
628 (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal  
629 fungi. *New Phytologist* **139**, 375-388.
- 630 **Bago B, Zipfel W, Williams RM, Jun J, Arreola R, Lammers PJ, Pfeffer PE,**  
631 **Shachar-Hill Y.** 2002. Translocation and utilization of fungal storage lipid in the  
632 arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* **128**, 108-124.
- 633 **Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Doude DD,**  
634 **Lammers PJ, Shachar-Hill Y.** 2003. Carbon export from arbuscular mycorrhizal  
635 roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology*  
636 **131**, 1496-1507.
- 637 **Balestrini R, Gómez-Ariza J, Lanfranco L, Bonfante P.** 2007. Laser  
638 microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate  
639 transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Molecular*  
640 *Plant-Microbe Interactions* **20**, 1055-1062.
- 641 **Bécard G, Fortin JA.** 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza  
642 formation on Ri-T-DNA transformed roots. *New Phytologist* **108**, 211-218.
- 643 **Becker DA, Grenberg RR, Stone SF.** 1992. The use of high accuracy NAA for the  
644 certification of NIST botanical standard reference materials. *Journal of*  
645 *Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **160**, 41-53.
- 646 **Benedetto A, Magurno F, Bonfante P, Lanfranco L.** 2005. Expression profiles of  
647 a phosphate transporter gene (GmosPT) from the endomycorrhizal fungus *Glomus*  
648 *mosseae*. *Mycorrhiza* **15**, 620-627.
- 649 **Bun-Ya M, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y.** 1991. The *PHO84* gene of  
650 *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Molecular*  
651 *and Cellular Biology* **11**, 3229-3238.
- 652 **Calonne M., Lounès-Hadj Sahraoui A., Campagnac E., Debiante D., Laruelle F.,**  
653 **Grandmougin-Ferjani A., Fontaine J.** 2012. Propiconazole inhibits the sterol 14 $\alpha$ -

- 654 demethylase in *Glomus irregulare* like in phytopathogenic fungi. *Chemosphere* **87**,  
655 376-383.
- 656 **Campagnac E., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A., Laruelle F., Durand R.,**  
657 **Grandmougin-Ferjani A.** 2008. Differential effects of fenpropimorph and  
658 fenhexamid, two sterol biosynthesis inhibitor fungicides, on arbuscular mycorrhizal  
659 development and sterol metabolism in carrot roots. *Phytochemistry* **69**, 2912-2919.
- 660 **Campagnac E., Lounès - Hadj Sahraoui A., Debiane D., Fontaine J., Laruelle F.,**  
661 **Garçon G., Verdin A., Durand R., Shirali P., Grandmougin-Ferjani A.** 2010.  
662 Arbuscular mycorrhiza partially protect chicory roots against oxidative stress  
663 induced by two fungicides, fenpropimorph and fenhexamid. *Mycorrhiza* **20**, 167-178.
- 664 **Cheung KC, Zhang JY, Deng HH, Ou YK, Leung HM, Wu SC, Wong MH.**  
665 2008. Interaction of higher plant (jute), electrofused bacteria and mycorrhiza on  
666 anthracene biodegradation. *Bioresource Technology* **99**, 2148-2155.
- 667 **Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Grandmougin-Ferjani**  
668 **A, Shirali P, Lounès-Hadj Sahraoui A.** 2008. *In vitro* evaluation of the oxidative  
669 stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots.  
670 *Environmental and Experimental Botany* **64**, 120-127.
- 671 **Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Shirali P,**  
672 **Grandmougin-Ferjani A, Lounès-Hadj Sahraoui A.** 2009. Mycorrhization  
673 alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model.  
674 *Phytochemistry* **70**, 1421-1427.
- 675 **Debiane D, Calonne M, Fontaine J, Laruelle F, Grandmougin-Ferjani A,**  
676 **Lounès-Hadj Sahraoui A.** 2011. Lipid content disturbance in the arbuscular  
677 mycorrhizal, *Glomus irregulare* grown in monoxenic conditions under PAHs  
678 pollution. *Fungal Biology* **115**, 782-792.
- 679 **Debiane D, Calonne M, Fontaine J, Laruelle F, Grandmougin-Ferjani A,**  
680 **Lounès-Hadj Sahraoui A.** 2012. Benzo[a]pyrene induced lipid changes in the  
681 monoxenic arbuscular mycorrhizal chicory roots. *Journal of Hazardous Materials*  
682 **209-210**, 18-26.
- 683 **Declerck S, D'Or D, Cranenbrouck S, Le Boulengé E.** 2001. Modelling the  
684 sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in monoxenic culture.  
685 *Mycorrhiza* **11**, 225-230.
- 686 **Delory GE, King EJ.** 1945. A sodium carbonate–bicarbonate buffer for alkaline  
687 phosphatases. *Biochemistry* **39**, 16.

- 688 **Doner LW, Bécard G.** 1991. Solubilization of gellan gels by chelation of cations.  
689 *Biotechnology Techniques* **5**, 25-28.
- 690 **Dupré de Boulois H, Delvaux B, Declerck S.** 2005. Effects of arbuscular  
691 mycorrhizal fungi on the root uptake and translocation of radiocesium.  
692 *Environmental Pollution* **134**, 515-524.
- 693 **Ezawa T, Kuwahara S, Sakamoto K, Yoshida T, Saito M.** 1999. Specific inhibitor  
694 and substrate specificity of alkaline phosphatase expressed in the symbiotic phase of  
695 the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus etunicatum*. *Mycologia* **91**, 636-641.
- 696 **Ezawa T, Smith SE, Smith FA.** 2001. Differentiation of polyphosphate metabolism  
697 between the extra- and intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New*  
698 *Phytologist* **149**, 555-563.
- 699 **Ezawa T, Cavagnaro TR, Smith SE, Smith FA, Ohtomo R.** 2004. Rapid  
700 accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal  
701 fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase/luciferase system.  
702 *New Phytologist* **161**, 387-392.
- 703 **Fontaine J, Grandmougin-Ferjani A, Glorian V, Durand R.** 2004. 24-  
704 methyl/methylene sterols increase in monoxenic roots after colonization by  
705 arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **163**, 159-167.
- 706 **Franco-Ramírez A, Ferrera-Cerrato R, Varela-Fregoso L, Pérez-Moreno J,**  
707 **Alarcón A.** 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi in chronically petroleum-  
708 contaminated soils in Mexico and the effects of petroleum hydrocarbons on spore  
709 germination. *Journal of Basic Microbiology* **47**, 378-383.
- 710 **Gan S, Lau EV, Ng HK.** 2009. Remediation of soils contaminated with polycyclic  
711 aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials* **172**, 532-549.
- 712 **Gao Y, Cheng Z, Ling W, Huang J.** 2010. Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae  
713 contribute to the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant roots.  
714 *Bioresource Technology* **101**, 6895-6901.
- 715 **Gao Y, Li Q, Ling W, Zhu X.** 2011. Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of  
716 soils contaminated with phenanthrene and pyrene. *Journal of Hazardous Materials*  
717 **185**, 703-709.
- 718 **Gaspar ML, Cabello MN, Cazau MC, Pollero RJ.** 2002. Effect of phenanthrene  
719 and *Rhodotorula glutinis* on arbuscular mycorrhizal fungus colonization of maize  
720 roots. *Mycorrhiza* **12**, 55-59.

- 721 **Green A.** 1933. The preparation of acetate and phosphate buffer solutions of known  
722 pH and ionic strength. *Journal of American Chemical Society* **55**, 2331-2336
- 723 **Harrison MJ, Van Buuren ML.** 1995. A phosphate transporter from the  
724 mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **378**, 626-629.
- 725 **Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H.** 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal  
726 tolerance. *Phytochemistry* **68**, 139-146.
- 727 **Javot H, Pumplin N, Harrison MJ.** 2007a. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal  
728 symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell and Environment* **30**,  
729 310-322.
- 730 **Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ.** 2007b. A *Medicago*  
731 *truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal  
732 symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 1720-1725.
- 733 **Joner EJ, Leyval C.** 2001. Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and  
734 ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons.  
735 *Mycorrhiza* **10**, 155-159.
- 736 **Larsen J, Thingstrup I, Jakobsen I, Rosendhal S.** 1996. Benomyl inhibits  
737 phosphorus transport but not fungal alkaline phosphatase activity in a *Glomus*-  
738 cucumber symbiosis. *New Phytologist* **132**, 127-133.
- 739 **Leyval C, Binet P.** 1998. Effect of polyaromatic hydrocarbons in soil on arbuscular  
740 mycorrhizal plants. *Journal of Environmental Quality* **27**: 402-407.
- 741 **Leyval C, Joner EJ, Del Val C, Haselwandter K.** 2002. Potential of arbuscular  
742 mycorrhizal fungi for bioremediation. In: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea J-M,  
743 Haselwandter K, eds. *Mycorrhizal Technology in Agriculture: from genes to*  
744 *bioproducts*. Birkhäuser, Springer Verlag.
- 745 **Liu A, Dalpé Y.** 2009. Reduction in soil polycyclic aromatic hydrocarbons by  
746 arbuscular mycorrhizal leek plant. *International Journal of Phytoremediation* **11**, 39-  
747 52.
- 748 **Liu SL, Luo YM, Cao ZH, Wu LH, Ding KQ, Christie P.** 2004. Degradation of  
749 benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environmental*  
750 *Geochemistry and Health* **26**, 285-293.
- 751 **Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ.** 2001. A phosphate  
752 transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal  
753 fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the  
754 environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 1140-1148.



- 755 **Marschner H.** 1995. *Mineral nutrition of higher plants*, 2<sup>nd</sup> Edition. Boston:  
756 Academic Press.
- 757 **Mastrangelo G, Fadda E, Marzia V.** 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons and  
758 cancer in man. *Environmental Health Perspectives* **104**, 1166-1170.
- 759 **McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA.** 1990. A method  
760 which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular  
761 mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **115**, 495-501.
- 762 **Nagahashi G, Doner L, Abney G, Tsao A.** 1993. The low temperature, rapid  
763 dissolution of gellan away from root cultures. *Chemistry and Materials Science* **7**,  
764 467-472.
- 765 **Newman EI.** 1966. A method of estimating total of roots in a sample. *Journal of*  
766 *Ecology* **3**, 139-145.
- 767 **Nielsen JS, Joner EJ, Declerck S, Olsson S, Jakobsen I.** 2002. Phospho-imaging  
768 as a tool for visualization and noninvasive measurement of P transport dynamics in  
769 arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* **154**, 809-819.
- 770 **Olsson PA, Van Aarle IM, Allaway WG, Ashford AE, Rouhier H.** 2002.  
771 Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza  
772 cultures. *Plant Physiology* **130**, 1162-1171.
- 773 **Pao SS, Paulsen IT, Saier MH.** 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiology*  
774 *and Molecular Biology* **62**, 1-34.
- 775 **Pfeffer PE, Douds DD, Bücking H, Schwartz DP, Shachar-Hill Y.** 2004. The  
776 fungus does not transfer carbon to or between roots in an arbuscular mycorrhizal  
777 symbiosis. *New Phytologist* **163**, 617-627.
- 778 **Phillips JM, Hayman DS.** 1970. Improved procedures for clearing roots and  
779 staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of  
780 infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**, 158-161.
- 781 **Pilon-Smits E.** 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 15-39.
- 782 **Porcel R, Aroca R, Ruiz-Lozano JM.** 2012. Salinity stress alleviation using  
783 arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**,  
784 181-200.
- 785 **Rabie GH.** 2005. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of soil  
786 rhizosphere spiked with poly aromatic hydrocarbons. *Mycobiology* **33**, 41-50.

- 787 **Rasmussen R.** 2001. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittner C,  
788 Nakagawara K, eds. *Rapid cycle realtime PCR methods and applications*.  
789 Heidelberg: Springer, p 21-34.
- 790 **Richardson AE, Hocking PJ, Simpson RJ, George TS.** 2009. Plant mechanisms to  
791 optimise access to soil phosphorus. *Crop & Pasture Science* **60**, 124-143.
- 792 **Sanyal SK, De Datta SK.** 1991. Chemistry of phosphorus transformations in soil.  
793 *Advances in Soil Science* **16**, 1-120.
- 794 **Schüßler A, Walker C.** 2010. The *Glomeromycota*. A species list with new families  
795 and new genera. p 56.
- 796 **Smith SE, Jakobsen I, Grønlund M, Smith FA.** 2011. Roles of arbuscular  
797 mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of  
798 phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for  
799 understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant physiology* **156**,  
800 1050-1057.
- 801 **St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA.** 1996. Enhanced hyphal  
802 growth and spore production of the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus*  
803 *intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycological Research*  
804 **100**, 328-332.
- 805 **Susarla S, Medina VF, McCutcheon SC.** 2002. Phytoremediation: an ecological  
806 solution to organic chemical contamination.
- 807 **Thomson BD, Clarckson DT, Brain P.** 1990. Kinetics of phosphorus uptake by the  
808 germ-tubes of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*.  
809 *New Phytologist* **116**, 647-653.
- 810 **Van Aarle IM, Rouhier H, Saito M.** 2002. Phosphatase activities of arbuscular  
811 mycorrhizal intraradical and extraradical mycelium, and their relation to phosphorus  
812 availability. *Mycological Research* **106**, 1224-1229.
- 813 **Van Aarle IM, Olsson PA.** 2008. Resource partitioning between extraradical and  
814 intraradical AM fungal mycelium. In: Varma A, ed. *Mycorrhiza: State of the Art,*  
815 *Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology,*  
816 *Structure and Systematics*, 3rd Edition. Heildeberg: Springer, 321-336.
- 817 **Verdin A, Lounès-Hadj Sahraoui A, Newsam R, Robinson G, Durand R.** 2005.  
818 Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid  
819 vesicles. *Environmental Pollution* **133**, 283-291.

- 820 **Wu FY, Yu XZ, Wu SC, Lin XG, Wong MH.** 2011. Phenanthrene and pyrene  
821 uptake by arbuscular mycorrhizal maize and their dissipation in soil. *Journal of*  
822 *Hazardous Materials* **187**, 341-347.
- 823 **Zocco D, Fontaine J, Lozanova E, Renard L, Bivort C, Durand R,**  
824 **Grandmougin-Ferjani A, Declerck S.** 2008. Effects of two sterol biosynthesis  
825 inhibitor fungicides (fenpropimorph and fenhexamid) on the development of an  
826 arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycological Research* **112**, 592-601.
- 827 **Zocco D, Van Aarle IM, Oger E, Lanfranco L, Declerck S.** 2011. Fenpropimorph  
828 and fenhexamid impact phosphorus translocation by arbuscular mycorrhizal fungi.  
829 *Mycorrhiza* **21**, 363-374.

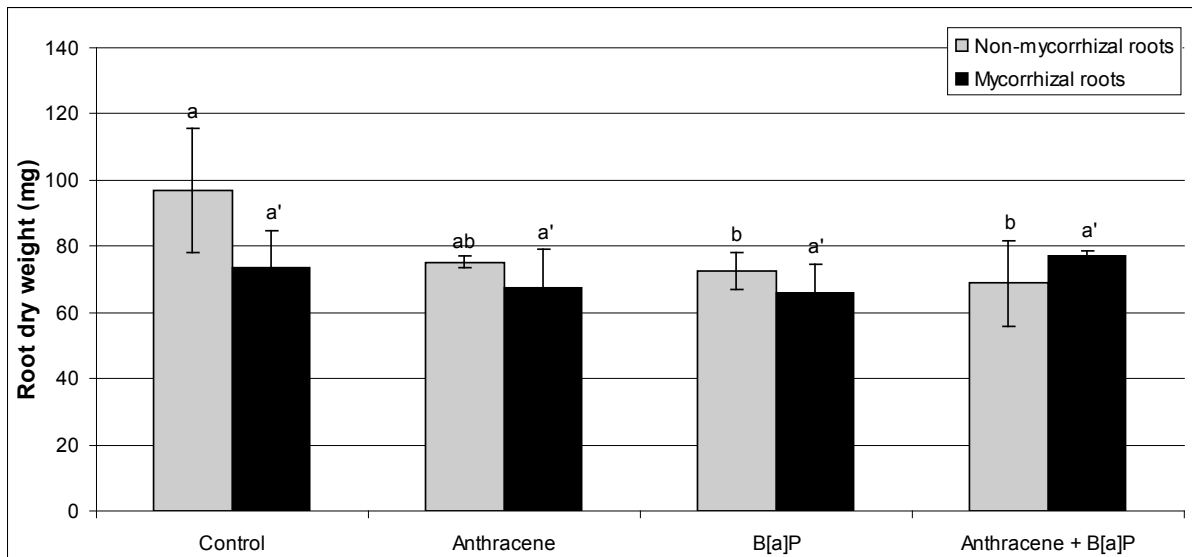


Fig. 1. Dry weight of mycorrhizal and non-mycorrhizal chicory roots after 9 weeks of growth in absence (control) or presence of PAHs [anthracene, benzo[a]pyrene (B[a]P) and a combination of both (anthracene + B[a]P)] at the concentration of 280  $\mu$ M in the mono-compartmental Petri dish. Data are presented as means  $\pm$  SD. Different letters (a, b, a', b') indicate significant differences between the respective controls and the PAH treatments, as determined by ANOVA followed by a multiple range test (LSD) ( $p \leq 0.05$ ). The presence of \* indicates a significant difference between mycorrhizal and non-mycorrhizal root dry weight.

	Control	Anthracene	B[a]P	Anthracene + B[a]P
<b>Hyphal length (cm by Petri dish)</b>	2701 $\pm$ 229 <sup>a</sup>	1038.4 $\pm$ 303.9 <sup>b</sup>	889.3 $\pm$ 109.4 <sup>b</sup>	749.1 $\pm$ 37.5 <sup>b</sup>
<b>Spore number</b>	3223 $\pm$ 696 <sup>a</sup>	805 $\pm$ 389 <sup>b</sup>	1129 $\pm$ 587 <sup>b</sup>	492 $\pm$ 152 <sup>b</sup>
<b>%T</b>	65 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	39 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	45 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	20 $\pm$ 11 <sup>c</sup>
<b>%A</b>	26 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	17 $\pm$ 2 <sup>ab</sup>	18 $\pm$ 14 <sup>ab</sup>	6 $\pm$ 5 <sup>b</sup>
<b>%V</b>	20 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	17 $\pm$ 3 <sup>ab</sup>	16 $\pm$ 6 <sup>ab</sup>	8 $\pm$ 7 <sup>b</sup>

Table 1. Extraradical hyphal length (cm/Petri dish), spore number and root colonization of chicory plants estimated as (total (%T), arbuscular (%A) and intraradical spores/vesicles (%V) colonization) after 9 weeks of growth in mono-compartmented Petri dishes in absence (control) or presence of PAHs [anthracene, benzo[a]pyrene (B[a]P) and a combination of both (anthracene + B[a]P)] at the concentration of 280  $\mu$ M. Data are presented as means  $\pm$  SD. Values in the same row followed by identical letter do not differ significantly, as determined by ANOVA followed by a multiple range test (LSD) ( $p \leq 0.05$ ).

		Control	Anthracene	B[a]P	Anthracene + B[a]P
HC	Crossing hyphae number	84 ± 23 <sup>a</sup>	69 ± 15 <sup>a</sup>	83 ± 39 <sup>a</sup>	62 ± 18 <sup>a</sup>
	BAS number cm <sup>-1</sup> of hyphae	0.66 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.12 <sup>a</sup>
RC	%T	51 ± 21 <sup>a</sup>	53 ± 8 <sup>a</sup>	53 ± 5 <sup>a</sup>	46 ± 15 <sup>a</sup>
	%A	27 ± 15 <sup>a</sup>	26 ± 8 <sup>a</sup>	23 ± 6 <sup>a</sup>	26 ± 16 <sup>a</sup>
	%V	27 ± 16 <sup>a</sup>	32 ± 10 <sup>a</sup>	28 ± 6 <sup>a</sup>	24 ± 16 <sup>a</sup>

Table 2. Number of hyphae crossing the plastic wall separating the RC from HC and BAS number/cm of hyphae of *R. irregularis* after 6 weeks of growth in absence (control) or presence of PAHs [anthracene, benzo[a]pyrene (B[a]P) and a combination of both (anthracene + B[a]P)] at the concentration of 280 µM, in the HC of bi-compartmented Petri dish and colonization [total (%T), arbuscular (%A) and intraradical spores/vesicles (%V)] of chicory roots grown in the absence of PAHs in the RC of bi-compartmented Petri dish. Data are presented as means ± SD. Values in the same row followed by identical letter do not differ significantly, as determined by ANOVA followed by a multiple range test (LSD) (p≤0.05).

	Activity (Bq) measured in the compartment	Control	Anthracene	B[a]P	Anthracene + B[a]P
RC	<sup>33</sup> P activity in the roots	32181 ± 6966 <sup>a</sup>	30286 ± 4560 <sup>ab</sup>	23902 ± 4665 <sup>b</sup>	24404 ± 4059 <sup>b</sup>
	Roots (per mg of mycelium in the HC)	13753 ± 2977 <sup>a</sup>	13642 ± 2244 <sup>a</sup>	10171 ± 1985 <sup>b</sup>	10895 ± 1812 <sup>b</sup>
	<sup>33</sup> P activity in the solid medium with fungal mycelium	1409 ± 572 <sup>a</sup>	1235 ± 437 <sup>a</sup>	3419 ± 2098 <sup>b</sup>	2833 ± 1266 <sup>b</sup>
HC	<sup>33</sup> P activity in the solid medium with fungal mycelium	19759 ± 6875 <sup>a</sup>	28578 ± 10428 <sup>a</sup>	21910 ± 3422 <sup>a</sup>	24579 ± 8320 <sup>a</sup>

Table 3. Phosphorus (<sup>33</sup>P) activity (Bq) measured (1) in the roots (2) in the roots per mg of mycelium dry weight in the HC, (3) in the gelled medium of the RC containing the mycelium and (4) in the gelled medium of the HC containing the mycelium of Petri dish in absence (control) or presence of PAHs [anthracene, benzo[a]pyrene (B[a]P) and a combination of both (anthracene + B[a]P)] at the concentration of 280 µM added to the HC. The AMF (*R. irregularis*) was allowed to grow for 6 weeks in the HC before <sup>33</sup>P addition. The measure of activity was done 72h after addition of <sup>33</sup>P. Data are presented as means ± SD. Values in the same row followed by identical letter do not differ significantly, as determined by ANOVA followed by a multiple range test (LSD) (p≤0.05).

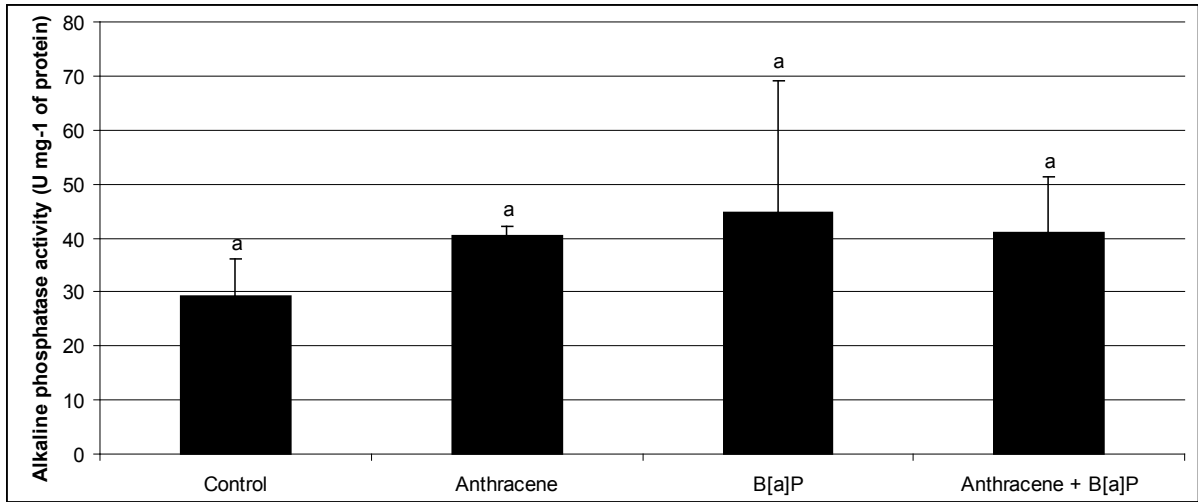


Fig. 2. Alkaline phosphatase activity ( $\text{U mg}^{-1}$  of protein) measured in the extraradical hyphae of *R. irregularis* after 6 weeks of growth in absence (control) or presence of PAHs [anthracene, benzo[a]pyrene (B[a]P) and a combination of both (anthracene + B[a]P)] at the concentration of  $280 \mu\text{M}$ , in the HC of bi-compartmented Petri dish. Data are presented as means  $\pm$  SD. Different letters (a, b) indicate significant differences between the respective controls and the PAH treatments, as determined by the Mann-Whitney U test ( $p \leq 0.05$ ).

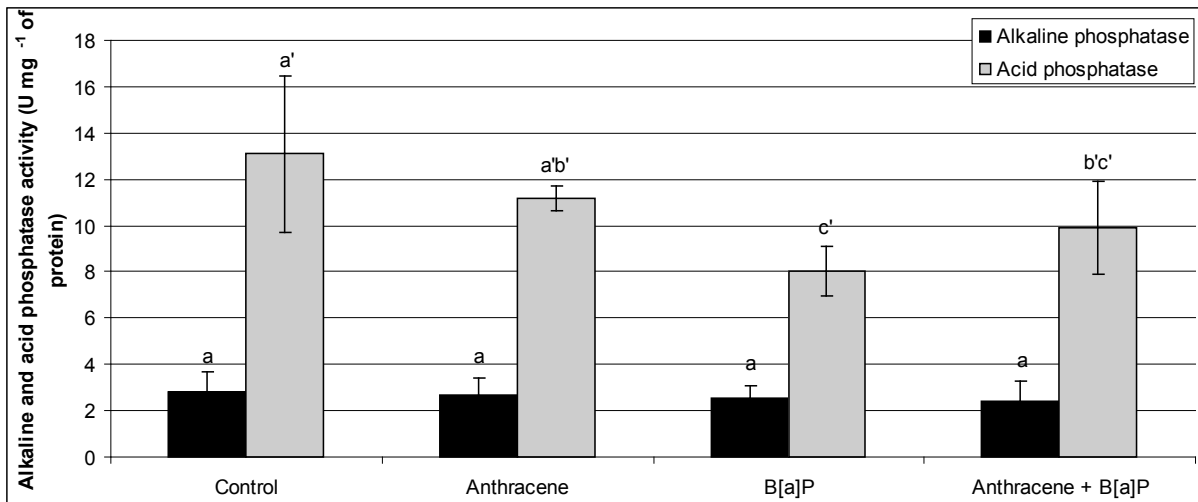


Fig. 3. Alkaline and acid phosphatase activity ( $\text{U mg}^{-1}$  of protein) in the chicory roots after 9 weeks of growth in absence of PAHs in the RC of bi-compartmented Petri dishes and colonized by the AMF *R. irregularis* grown in the absence (control) or presence of PAHs [anthracene, benzo[a]pyrene (B[a]P) and a combination of both (anthracene + B[a]P)] at the concentration of  $280 \mu\text{M}$  in the HC of bi-compartmented Petri dish. Data are presented as means  $\pm$  SD. Different letters (a, b, a', b', c') indicate significant differences between the respective controls and the PAH treatments, as determined by ANOVA followed by a multiple range test (LSD) ( $p \leq 0.05$ ).

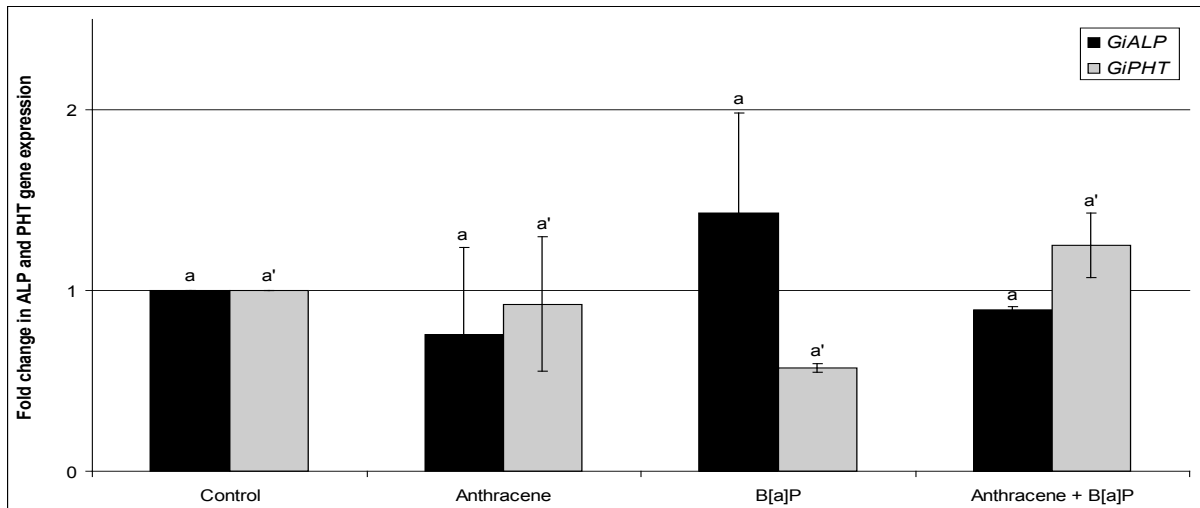


Fig. 4. Real-time RT-PCR analysis of the *GiALP* and *GiPT* gene expression of *R. irregularis*, after 6 weeks of growth in absence (control) or presence of PAHs [anthracene, benzo[a]pyrene (B[a]P) and a combination of both (anthracene + B[a]P)] at the concentration of 280  $\mu$ M, in the HC of bi-compartmented Petri dish. Data are presented as means  $\pm$  SD. Different letters (a, b, a', b') indicate significant differences between the respective controls and PAH treatments, as determined by ANOVA followed by a multiple range test (LSD) ( $p \leq 0.05$ ). Relative expression levels were obtained with the Ct method and were normalized with the *18S* gene expression.

## Principaux résultats

L'un des principaux résultats de cette étude est la chute du  $^{33}\text{P}$  quantifié dans les racines de chicorée mycorhizées quand le mycélium extra-racinaire du CMA s'est développé en présence du B[a]P, indiquant un effet négatif de cet HAP sur le transport du P par le CMA extra-racinaire vers les racines. Cette altération d'une des fonctions essentielles de la symbiose mycorhizienne pourrait résulter soit de la perturbation de la première étape qui correspond au prélèvement du P par les hyphes extra-racinaires dans le milieu de culture, soit de la perturbation de la deuxième étape correspondant à la translocation du P par le mycélium extra-racinaire vers le mycélium intra-racinaire, soit de la perturbation de la troisième étape correspondant au transfert du P du mycélium intra-racinaire vers la racine ou alors de la perturbation des différentes étapes.

Cependant, les éléments de réponse obtenus lors de cette expérience suggèrent que ce ne serait pas l'étape du prélèvement du P par le mycélium extra-racinaire qui serait affectée :

- 1- Les activités phosphatases alcalines dosées dans le mycélium extra-racinaire du CMA sont identiques que celui-ci soit cultivé en absence ou en présence d'HAPs,
- 2- Aucun changement dans l'expression des gènes *GiALP* (codant pour une famille de phosphatase alcaline), et *GiPT* (codant pour un transporteur de P) n'a été mesuré,
- 3- La quantité de  $^{33}\text{P}$  résiduelle dans le compartiment fongique est similaire entre le milieu contenant ou pas les HAPs,
- 4- Le nombre de BAS par cm d'hyphes est le même avec ou sans HAPs.

Ce résultat corrobore celui d'Ezawa et al. (2004) qui ont démontré que l'absorption de P et la biosynthèse des poly-P dans le CMA sont très rapides. Ces auteurs ont alors émis l'hypothèse selon laquelle le facteur limitant à la délivrance de P à la plante est le transfert à l'hôte végétal.

De même, il semblerait que la chute de la quantité de P dans les racines ne soit pas le résultat d'une altération de la translocation du P du mycélium extra- vers le mycélium intra-racinaire puisque le nombre total d'hyphes traversant la paroi entre les deux compartiments de la boîte de Pétri reste identique quel que soit le traitement en HAP appliqué dans le milieu de culture.

Ainsi, dans les racines mycorhizées, il semblerait que ce soit la chute de l'activité des phosphatases acides fongiques et non racinaires (puisque les racines se sont développées sur un milieu ne contenant pas les HAPs) qui serait à l'origine de la diminution de la quantité de  $^{33}\text{P}$  transférée dans les racines. De plus, la quantité de  $^{33}\text{P}$  accumulé dans le mycélium extra-



racinaire de *Rhizophagus irregularis* du compartiment racinaire corrobore l'hypothèse d'une inhibition des activités phosphatases acides fongiques. En effet, une inhibition de l'hydrolyse des poly-P conduirait à une accumulation de P dans les hyphes du CMA.

*En résumé, la présente étude montre que les HAPs peuvent avoir un effet négatif sur les activités métaboliques de Rhizophagus irregularis, pouvant entraver l'établissement d'une symbiose fonctionnelle dans les sols pollués, notamment en affectant la nutrition phosphatée de la plante. En effet, la quantité de  $^{33}\text{P}$  transférée dans les racines diminue en présence d'HAPs. Cependant, nos résultats semblent indiquer que le prélèvement du P par les hyphes extra-racinaires ainsi que la translocation jusque dans les hyphes intra-racinaires ne soient pas affectés par les HAPs. Le nombre de BAS par cm d'hyphe, la quantité résiduelle de  $^{33}\text{P}$  dans le compartiment fongique, les activités phosphatases alcalines fongiques et l'expression des gènes GiPT et GiALP restent constants que le mycélium extra-racinaire de Rhizophagus irregularis se soit développé dans un milieu contenant ou pas des HAPs.*

*L'impact des HAPs observé au niveau du transport du P résulterait d'une inhibition des activités des enzymes phosphatases acides fongiques, hydrolysant les groupements poly-P avant transfert à la plante au niveau de l'interface symbiotique.*

# Article 3

*In vitro* benzo[a]pyrene degradation  
by the arbuscular mycorrhizal fungus  
*Rhizophagus irregularis*

Calonne, M., Debiane, D., Fontaine, J., Grandmougin-Ferjani, A.,  
Lounès-Hadj Sahraoui, A.

*Soumis dans Environmental Pollution*



## Présentation de l'article 3

---

### Introduction - Objectif

Des résultats antérieurs obtenus à l'UCEIV ont montré un effet inhibiteur des HAPs vis-à-vis du développement des racines de chicorée et du CMA *Rhizophagus irregularis*. Ces fongici- et phytotoxicités des HAPs ont été expliquées par des dommages génotoxiques (mis en évidence par la 8-OHdG, marqueur d'altération à l'ADN) et la chute des contenus lipidiques membranaires (les stérols et les PL) des deux symbiotes de l'association mycorhizienne (Debiane et al., 2008, 2009, 2011, 2012, article 1). La peroxydation lipidique, révélée par l'accumulation de MDA (Debiane et al., 2008, 2009, 2011) mais aussi la perturbation du métabolisme lipidique du CMA cultivé sur milieu additionné avec du B[a]P (article 1) seraient à l'origine de ces altérations membranaires. Ces dommages au niveau membranaire peuvent avoir des conséquences diverses au niveau du fonctionnement des cellules fongiques dont une perturbation sur l'un des bénéfiques de la mycorhization, à savoir le transport du P par le CMA du milieu vers la racine, comme nous l'avons montré dans l'article 2.

Toutefois, bien que les HAPs montrent des effets négatifs sur le développement des deux partenaires de la symbiose mycorhizienne et sur la nutrition phosphatée, non seulement la colonisation mycorhizienne reste possible mais elle permet à la fois l'atténuation de la phytotoxicité des polluants en réduisant le stress oxydant induit (Debiane et al., 2008, 2009) et l'amélioration de la dissipation\* des HAPs. Une meilleure dissipation des HAPs, notamment du B[a]P, a déjà été montrée dans les sols cultivés avec des plantes de luzerne, blé, poireau, soja vert et jute mycorhizées par rapport aux sols cultivés avec des plantes non-mycorhizées (Liu et al., 2004; Rabie, 2005; Cheung et al., 2008; Liu et Dalpé, 2009; Gao et al., 2011). Néanmoins, ces travaux évaluent les teneurs en HAPs résiduels dans les sols sans préciser le devenir (bioaccumulation et/ou dégradation) de ces HAPs. Par ailleurs, le rôle du CMA dans cette dissipation des HAPs n'a jamais été déterminé. En effet, les systèmes de culture ainsi que les conditions de culture employés ne le permettraient pas.

Grâce à l'utilisation des cultures *in vitro*, nos précédents travaux au sein de l'UCEIV ont montré la contribution positive des CMA dans la dégradation de l'anthracène (HAP de faible poids moléculaire) en l'absence de tout autre microorganisme tellurique. Cependant, ni

la dissipation des HAPs lourds par les symbiotes, ni la contribution directe du CMA dans la dégradation de ces polluants n'ont été abordés à ce jour.

C'est pourquoi, l'objectif du présent travail a consisté à étudier la dégradation d'un HAP lourd, le B[a]P, par les deux partenaires symbiotiques: racines de chicorée transformées/*Rhizophagus irregularis*. L'implication directe du CMA *Rhizophagus irregularis* dans la dégradation a également été recherchée en utilisant des boîtes bi-compartmentées, permettant de mettre en contact seulement les hyphes extra-racinaires avec le B[a]P. Enfin, de potentiels métabolites issus de la dégradation du B[a]P par les deux organismes symbiotiques ont été recherchés.

\* Dissipation des HAPs : quantité d'HAPs ayant disparue du milieu de culture. Elle correspond à la somme des quantités d'HAPs bioaccumulés et biodégradés par les organismes vivants.

Dans notre étude, pour estimer la dissipation du B[a]P nous avons appliqué la formule suivante : concentration de B[a]P dissipé = concentration de B[a]P du témoin abiotique - concentration de B[a]P résiduel dans le milieu de culture.

Concentration du B[a]P dégradé = concentration de B[a]P dissipé - concentration du B[a]P bioaccumulé.

1 *In vitro* benzo[a]pyrene degradation

2 by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*

3  
4 Calonne, M., Debiante, D., Fontaine, J., Grandmougin-Ferjani, A.,  
5 Lounès-Hadj Saharaoui, A.\*

6  
7 Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, Université du Littoral Côte d'Opale,  
8 Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV), F-62228 Calais, France  
9 \* corresponding author. *E-mail*: lounes@univ-littoral.fr. *Tel*: +33 3 21 46 36 58

10  
11 Abstract

12 The benzo[a]pyrene (B[a]P) (a high molecular polycyclic aromatic hydrocarbon)  
13 dissipation by the arbuscular mycorrhizal symbiosis and for the first time by an arbuscular  
14 mycorrhizal fungus (AMF) was investigated by using mono- and bi-compartmental *in vitro*  
15 cultures respectively. Our results showed that mycorrhizal and non-mycorrhizal chicory roots  
16 are able to bioaccumulate and to degrade the high molecular weight PAH: B[a]P in the  
17 absence of rhizospheric microorganisms. Moreover, the present results revealed for the first  
18 time the capacity of the AMF *Rhizophagus irregularis* to degrade a PAH. In addition, our  
19 work highlighted the production of a B[a]P-degradation metabolite, a phthalate derivative,  
20 which was accumulated both in the roots and in the AMF. It is suggested that this B[a]P-  
21 metabolization could be the result of an oxidative stress induction and of antioxidative  
22 enzyme activities, as peroxidases, which could induce the B[a]P ring fission and the  
23 production of phthalate derivative.

24  
25  
26 Keywords: Benzo[a]pyrene, arbuscular mycorrhiza, *Rhizophagus irregularis*,  
27 bioaccumulation, biodegradation

## 28 1. Introduction

29

30 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) resulting from the incomplete combustion  
31 and pyrolysis of fossil fuels or wood, and from the release of petroleum products (Manahan,  
32 1994) are widely found as a mixture of low ( $< 4$  rings) and high ( $\geq 4$  rings) molecular weight  
33 chemicals in soils. Many of them are highly toxic, mutagenic and/or carcinogenic to humans  
34 (Mastrangelo et al., 1996) and exhibit a detrimental effect on the flora and fauna of affected  
35 habitats (Samanta et al., 2002). Consequently, the US-EPA listed 16 priority PAHs to  
36 eliminate from polluted soils. Amongst them, we can found the high molecular weight PAH:  
37 benzo[a]pyrene (B[a]P).

38

39 To restore and to manage PAHs polluted soils, phytoremediation consisting in the use  
40 of the plants and their associated microorganisms to transform, sequester, immobilize and  
41 remove toxic pollutants in the soils (Susarla et al., 2002; Pilon-Smits, 2005) offers the  
42 advantage of being far less expensive and more ecologically compatible than the engineering-  
43 based approaches (Rugh, 2004).

44 Several studies reported the enhancement of PAHs polluted soil remediation in the  
45 presence of plants (Reilley et al., 1996; Liste and Alexander, 2000; Binet et al., 2000a, 2000b;  
46 Wei and Pan, 2010). Nevertheless, the dissipation of organic contaminants from soil is often  
47 attributed to microorganisms living in the rhizosphere associated with plant roots (Mueller  
48 and Shann, 2006). It is known that the majority of vascular plants establish symbiosis with  
49 arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). The fungi, in exchange for carbohydrates supplied by  
50 the plant, improve water and mineral nutrition of the plant and hence its growth (Smith and  
51 Read, 2008) and its tolerance to biotic and abiotic stresses like pollution (Debiane et al., 2008,  
52 2009, 2012). It is within this context that the arbuscular mycorrhizal symbiosis represents a

53 challenge for sustainable development. This issue is based not only on the exploitation of its  
54 potential to remove pollutants but also on its ability to protect plants against abiotic stresses  
55 such as pollutants.

56 Contradictory results were reported concerning the PAHs dissipation promoted by  
57 mycorrhizal symbiosis. Whereas no significant effect of mycorrhizal inoculation was detected  
58 on PAHs dissipation in pot culture of *Echinochloa polystachya* and maize colonized by  
59 *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* (Binet et al., 2000a; Alarcón et al., 2006; Wu et  
60 al., 2011), an increased dissipation of PAHs was observed in pot culture of clover, raygrass,  
61 alfalfa and leek roots inoculated with *Glomus mosseae*, *Glomus etunicatum*; *Glomus*  
62 *intraradices* and *Glomus versiforme* (Joner et al., 2001; Joner and Leyval, 2003; Cheung et  
63 al., 2008; Wu et al., 2008; Liu and Dalpé, 2009; Gao et al., 2010).

64 Using monoxenic cultures, Verdin et al. (2006) showed that one fraction of the  
65 dissipated anthracene quantity was bioaccumulated in the chicory root tissue. Gao and Zhu  
66 (2004) demonstrated that the root lipid content might be a good predictor for root PAHs  
67 accumulation. Indeed, many works suggested a correlation between the root uptake of  
68 lipophilic organic compounds such as PAHs and the lipid contents of the plants (Simonich  
69 and Hites, 1995; Chiou et al., 2001; Gao and Zhu, 2004).

70 However, even the PAHs dissipation and bioaccumulation promoted by plants was  
71 demonstrated, very few investigations pointed out the PAH-metabolization by the plants  
72 (Harms et al., 1977; Kolb and Harms, 2000; Harms, 2003). The effect of plant roots on the  
73 degradation of organic pollutants has mainly been attributed to increased microbial numbers  
74 and selection of specialized microbial communities in the rhizosphere (Reilley et al., 1996).  
75 Numerous PAHs, such as naphthalene, anthracene, fluoranthene, pyrene, phenanthrene, B[a]P  
76 and benz[a]anthracene can be metabolized by rhizospheric bacteria (Cerniglia, 1992; Juhasz  
77 and Naidu, 2000; Juhasz et al., 2003; Cébron et al., 2008) and saprotrophic fungi (Field et al.,



78 1992; Verdin et al., 2004). It is known that mycorrhiza modify the microbial communities and  
79 their abundance in soils (Pilon-Smits, 2005), both by enhancing root exudation and by  
80 changing the composition of root exudates. *Glomus mosseae* BEG 69 increased degrading  
81 bacterial populations and the expression of the naphthalene dioxygenase gene in the  
82 mycorrhizosphere of ryegrass (Corgié et al., 2006). Indeed, bacteria have aromatic ring-  
83 hydroxylating-dioxygenase (RHD<sub>α</sub>) enzymes that introduce two atoms of oxygen into PAHs  
84 to form a cis-dihydrodiol (Kim et al. 2006). The most studied PAH-RHD<sub>α</sub> is naphthalene 1,2  
85 dioxygenase from *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 (Kauppi et al., 1998) where the alpha  
86 subunit is encoded by the *nahAc* gene (Cébron et al., 2008). Other PAH-RHD<sub>α</sub> genes (*nahA3*,  
87 *nagAc*, *ndoB*, *ndoC2*, *pahAc*, *pahA3*, *phnAc*, *phnA1*, *bphAc*, *bphA1*, *dntAc* and *arhA1*) were  
88 isolated in numerous Gram- bacteria and (*narA*-like, *nidA/pdoA1*-like, *phdA/pdoA2*-like and  
89 *nidA3/fadA1*) in Gram+ bacteria (Habe and Omori, 2003; Cébron et al., 2008).

90 The diversity in the experimental procedures used in the reported studies led thus to  
91 some difficulties to compare obtained results. Indeed, PAHs dissipation and uptake by  
92 mycorrhiza may change according to effective PAH property and bioavailability (Chiou et al.,  
93 2001; Maliszewska-Kordybach, 2005; Watts et al., 2006), soil texture (Nam and Kim, 2002;  
94 Chiapusio et al., 2007), plant and AMF species (Fismes et al., 2002; Liu and Dalpé, 2009).  
95 Moreover, these culture conditions do not allow the observation of a direct PAHs-  
96 bioaccumulation and PAHs-metabolization by the AMF. The use of *in vitro* cultures could  
97 thus allow a better understanding of PAHs-metabolization promoting by the two mycorrhizal  
98 symbionts in the absence of rhizospheric organisms. Thus, Verdin et al. (2006) demonstrated  
99 that mycorrhizal inoculation of chicory roots grown *in vitro* enhanced the low molecular  
100 weight PAH, anthracene, dissipation in the absence of any telluric microflora. One fraction of  
101 the dissipated anthracene was found to be bioaccumulated in the lipid bodies of both plant  
102 cells and fungal hyphae and the second part was supposed to be biodegraded. However, no

103 data are available neither on the capacity of the arbuscular symbiosis to dissipate the high  
104 molecular weight PAH B[a]P nor on the ability of the AMF to degrade PAH which has never  
105 been described before.

106         Thereby, the present paper aims to investigate the ability to degrade the high  
107 molecular PAH, B[a]P, by the arbuscular mycorrhizal symbiosis chicory roots/ *Rhizophagus*  
108 *irregularis* and by the AMF alone thanks to mono- and bi-compartmental in vitro cultures  
109 respectively. The identification of the eventual B[a]P-degradation metabolites has also been  
110 undertaken.

111

## 112 2. Materials and Methods

113

### 114 *2.1. Mycorrhizal and non-mycorrhizal chicory root culture in the absence and in the presence* 115 *of B[a]P.*

116

117         To prepare PAH-enriched medium, B[a]P (Sigma Aldrich, St Louis, USA) was  
118 dispersed in gelatin/NaCl (0.5 g/0.9 g for 100 ml) and sonicated for 10 min at room  
119 temperature. 6 ml of diluted B[a]P solution were added to each flask containing 600 ml of M  
120 medium (Bécard and Fortin, 1988), solidified with 0.25% (w/v) gellan gum (Phytigel, Sigma,  
121 St Louis, MO, USA) and sterilized at 121°C during 30 min, to obtain a final concentration of  
122 280 µM. Culture medium was distributed in sterile Petri dishes of 90 mm diameter (25  
123 ml/Petri dish).

124         All experiments were carried out with monoxenic cultures of chicory roots (*Cichorium*  
125 *intybus* L.), transformed by *Agrobacterium rhizogenes* (Fontaine et al., 2004) and colonized  
126 or not by the AMF *Rhizophagus irregularis*, DAOM 197198 (Schüßler and Walker, 2010).

127 The mycorrhizal and non-mycorrhizal transformed chicory roots were grown on a  
128 modified M medium supplemented or not (control) with B[a]P at 280  $\mu$ M (70.8 mg/L) and  
129 incubated during 12 weeks at 27°C in the dark. Cultures were inoculated with a disk of  
130 medium containing the chicory roots, colonized or not by *Rhizophagus irregularis* and placed  
131 in the middle of the Petri dish. Another Petri dishes containing the medium supplemented  
132 with B[a]P but not the roots represented the abiotic control of this experience, they are also  
133 incubated for 12 weeks at 27°C in the dark.

134 After 12 weeks incubation, the residual and the accumulated B[a]P amounts were  
135 measured respectively in the medium as well as the in the roots.

136

137 2. 2. *Rhizophagus irregularis* culture in the absence and in the presence of B[a]P

138

139 Monoxenic cultures of *Rhizophagus irregularis* were carried out in bi-compartmental  
140 Petri dishes (9 cm) with a watertight plastic wall separating the root compartment (RC) from  
141 the fungal compartment (FC) (St Arnaud et al., 1996). RC was filled with 25 ml of M medium  
142 without B[a]P and inoculated with a piece of mycorrhizal roots After 3 weeks of incubation,  
143 the FC was filled with 30 ml of M medium supplemented or not (control) with B[a]P at 280  
144  $\mu$ M. This compartment was kept root free (by cutting) and used to investigate B[a]P  
145 dissipation by the AMF alone in FC.

146 Nine weeks after B[a]P addition in the FC, the residual and the accumulated B[a]P  
147 amounts were measured respectively in the medium as well as the in the extraradical AMF  
148 mycelium. Abiotic control without *Rhizophagus irregularis* in bi-compartmental Petri dishes  
149 was also incubated for 9 weeks at 27°C in the dark.

150

151

## 152 2.3. Triacylglycerol (TAG) extraction and analysis

153

154 TAG from the lyophilized non-mycorrhizal, mycorrhizal roots and *Rhizophagus*  
155 *irregularis* samples were extracted in 20 ml of dichloromethane/methanol (2/1, v/v) at 75°C  
156 during 2h. After filtration and concentration under N<sub>2</sub>, samples were collected in 2 ml of  
157 chloroform and applied to Solid Phase Extraction (SPE) cartridges. A silica gel bonded  
158 column (GracePure 3 ml volume, 500 mg sorbents, Grace Davidson Discovery Sciences,  
159 Alltech, Deerfield, USA) was used. After conditioning with 6 ml of hexane and 3 ml of  
160 chloroform/2-propanol (2/1; v/v), samples were added on the column. TAG were eluted with  
161 6 ml of the previous solvent. After solvent evaporation under vacuum, TAG were quantified  
162 in 1 ml of chloroform by HPLC.

163 TAG analyses were carried out using an HPLC Waters 600 Controller (Meadows  
164 Instrumentation Inc., Bristol, UK) equipped with an Alltech (Deerfield, USA) model 3300  
165 Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) and a silica analytical column (150 mm x 3.0  
166 mm, I.D. 3 µm) (Alltech, Deerfield, USA). A ternary gradient was generated during 54 min  
167 with eluent A of 2,2,4-trimethylpentane/methyl-tert-butyl-ether (98/2; v/v), eluent B of  
168 isopropanol/chloroforme/acetonitrile/acetic acid (84/8/8/0.025; v/v/v/v) and eluent C of  
169 isopropanol/H<sub>2</sub>O/triethylamine (50/50/0.2; v/v/v). The TAG chromatographic separations  
170 were carried out according to the following scheme:  $t_0$  min: 100% A at 1 ml/min,  $t_5$  min: 80%  
171 A and 20% B at 1 ml/min,  $t_{15}$  min: 44%A, 52%B and 4%C at 1 ml/min,  $t_{40}$  min: 34%A, 52%B  
172 and 14%C at 1.4 ml/min,  $t_{41}$  min: 30%A and 70%B at 1.40 ml/min,  $t_{46}$  min: 100%A at 1.80  
173 ml/min and  $t_{54}$  min: 100%A at 2 ml/min. The flow of N<sub>2</sub> was maintained at 1.5 ml/min and the  
174 drift tube was set at 45°C. The total chromatography run time was of 54 min per sample. TAG  
175 were identified by comparison to retention time of triolein, corresponding to 3 min.

176

## 177 2.4. B[a]P extraction

178

179 After 12 weeks of incubation, mycorrhizal and non-mycorrhizal roots grown in the  
180 mono-compartmental Petri dishes and the AMF *Rhizophagus irregularis* grown in the FC and  
181 the mycorrhizal roots grown in the RC of the bi-compartmental Petri dishes were separated  
182 from the culture medium by solubilising the solidified medium for 15 min under agitation in  
183 one vol. of Tris-HCl buffer (Tris 50 mM / EDTA 10 mM, pH 7.5) (Nagahashi et al., 1993).  
184 Roots and AMF were recovered by filtration on a 0.1 mm and 53 µm sieve respectively and  
185 were rinsed with 10 ml of dichloromethane to remove adsorbed B[a]P. This extract was added  
186 to the solubilised medium previously recovered. The washed roots and the AMF were  
187 lyophilized and dry weights were determined. B[a]P contained into the roots and the fungus  
188 was extracted with soxhlet apparatus (80 ml dichloromethane during 12h at 70°C, 1 recycling  
189 per hour), which corresponded to the bioaccumulated fraction. After concentration, B[a]P  
190 bioaccumulated in the symbiotic partners, and the residual B[a]P extracted from the medium  
191 cultures of the roots and *Rhizophagus irregularis* as well as from the abiotic medium were  
192 recovered in 25 ml of dichloromethane and were analyzed in gas chromatography with a  
193 flame ionization detector (GC-FID) (PerkinElmer, Autosystem, Norwalk, CT, USA) equipped  
194 with a glass capillary non-polar column EC-5<sup>TM</sup> Econo-Cap (Alltech Associates Inc,  
195 Deerfield, IL, USA) (30 m x 0.53 mm i.d.) with hydrogen as carrier gas (10 ml/min). The  
196 temperature program included a short initial hold at 55°C for 1 min, a fast rise from 55°C to  
197 230°C at 20°C/min and a hold for 29 min. Total run time reached 38 min and 45 sec. B[a]P  
198 concentration was quantified using a standard curve of commercial B[a]P.

199 B[a]P dissipation was estimated as B[a]P recovered from abiotic control minus  
200 residual B[a]P in the culture medium. B[a]P degradation was calculated as B[a]P dissipated

201 from the medium minus B[a]P extracted from the roots or from the extraradical mycelium  
202 (B[a]P bioaccumulation).

203

204 2.5. Isolation and identification of biodegradation products resulting from B[a]P  
205 metabolization by the roots or by the AMF.

206

207 Biodegradation products identification was done by gas chromatography-mass  
208 spectrometry (GC-MS) using specific fragmentation pattern.

209 GC was performed on a Varian 3800 gas chromatograph (Varian, Walnutcreek, CA,  
210 USA) equipped with a split-splitless injector and Varian 1200 mass spectrometer. The injector  
211 and detector temperatures were 295 and 300°C respectively. The temperature program  
212 included a short initial hold at 70°C for 2 min, a rise from 70°C to 150°C at 30°C/min, a  
213 second rise from 150°C to 200°C at 5°C/min, a third rise until 310°C at 4°C/min and a hold  
214 for 18 min. Total run time reached 60 min 10 sec. The helium flow-rate was maintained at 1  
215 ml/min. The samples were injected in a volume of 1 µl in the splitless mode. Electron  
216 ionization (EI) was used at 70 eV and the mass range scanned was 50-500 m/z.

217

218 2.6. Statistical analysis

219

220 Data (residual B[a]P, dissipation, accumulation and degradation by µg/mg of  
221 biological material dry weight) between non-mycorrhizal, mycorrhizal and *Rhizophagus*  
222 *irregularis* were compared by ANOVA, using Statgraphics release 5.1 (Manugistic, Inc.,  
223 Rockville, MD, USA). The method used to discriminate between the means was the LSD test  
224 ( $p \leq 0.05$ ). Levene's test of variance homogeneity was checked before the use of the multiple  
225 comparison procedure. Mann-Whitney U test ( $p \leq 0.05$ ) was used to compare the residual

226 B[a]P and its dissipation, bioaccumulation and degradation ( $\mu\text{g}/\text{Petri dish}$ ) between  
227 mycorrhizal and non-mycorrhizal chicory roots. The means were obtained from five  
228 replicates.

229

### 230 3. Results and discussion

231

#### 232 3.1. B[a]P degradation by mycorrhizal and non-mycorrhizal chicory roots.

233

234 Mycorrhizal and non-mycorrhizal roots were grown in the presence of B[a]P at 280  
235  $\mu\text{M}$  during 12 weeks. Firstly, to evaluate B[a]P abiotic losses, the residual B[a]P in root-free  
236 controls was analyzed after 12 weeks incubation time (Table 1). Abiotic B[a]P losses were  
237 estimated to about 41% of the initial concentration. Adsorption of B[a]P onto plastic dishes  
238 and glass materials probably contributed to these losses, as mentioned by Verdin et al. (2006)  
239 for anthracene. Residual, dissipated, bioaccumulated and degraded B[a]P amounts were  
240 therefore quantified with respect to the abiotic B[a]P data.

241 Our results showed that the quantity of residual B[a]P in the medium was similar both  
242 in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots corresponding to 74 and 72% of the recovered  
243 quantity of the B[a]P in the abiotic medium respectively (Table 1). We deduced that 26 and  
244 28% of the initial B[a]P concentration were dissipated from the mycorrhizal or non-  
245 mycorrhizal chicory roots media respectively. Enhanced PAHs dissipation in planted soil by  
246 plants has been reported by previous studies (Joner et al., 2001; Sun et al., 2010, 2011; Yu et  
247 al., 2011). This dissipation could result from the adsorption on roots (Binet et al., 2000a),  
248 from the leaching, the plant uptake and accumulation (Binet et al., 2000a; Gao and Zhu, 2004)  
249 as well as from the microorganisms living in the rhizosphere associated with plant roots  
250 (Mueller and Shann, 2006).

251 Our data obtained from *in vitro* cultures showed that the mycorrhizal inoculation by  
252 *Rhizophagus irregularis* did not enhance the B[a]P dissipation. This result is in line with the  
253 study of Alarcón et al. (2006) who worked with *Echinochloa polystachya* inoculated with  
254 *Gigaspora margarita* grown in glass-dark containers containing B[a]P spiked-river sand. On  
255 the contrary, an increased B[a]P dissipation in a contaminated soil was enhanced by alfalfa  
256 inoculated with *Glomus caledonium* (Liu et al., 2004). In fact, PAH dissipation by mycorrhiza  
257 may change according to AMF species (Liu and Dalpé, 2009), plant species, soil texture  
258 (Chiapusio et al., 2007) and the incubation time. Indeed, Joner et al. (2001) showed that  
259 whereas mycorrhizal and non-mycorrhizal clover and ryegrass dissipate the same  
260 concentration of chrysene and dibenz[a,h]anthracene after 8 weeks incubation, the dissipation  
261 was improved by mycorrhizal plants after 16 weeks incubation. However, most of the  
262 described experiments above were carried out on soils containing rhizospheric organisms,  
263 including bacteria and saprotrophic fungi which degradation activities may be enhanced by  
264 mycorrhizal inoculation (Joner et al., 2001; Joner and Leyval, 2003; Gao et al., 2011). Indeed,  
265 as reported by Joner et al. (2001), mycorrhizal colonization modifies the root exudation both  
266 qualitatively and quantitatively leading to the formation of an abundant extraradical mycelium  
267 which can influence the soil microbial community.

268 Nevertheless, the role played by the AMF in the enhancement of PAH dissipation  
269 remained unknown. The *in vitro* culture is thus a standardized culture method enabling  
270 quantification of the PAH dissipation by mycorrhizal and non-mycorrhizal roots in the  
271 absence of rhizospheric organisms. As reported by Verdin et al. (2006), the dissipation of  
272 anthracene by mycorrhizal and non-mycorrhizal chicory roots grown in *in vitro* cultures had  
273 two origins, the bioaccumulation in plant cells and fungal hyphae lipid bodies as well as the  
274 biodegradation. In the present study, we estimated the bioaccumulated fractions into the  
275 mycorrhizal and the non-mycorrhizal roots to 2% of the abiotic control. These



276 bioaccumulated fractions are lower than those reported by Verdin et al. (2006) with  
277 anthracene, which reached 36 and 29% in non-mycorrhizal and mycorrhizal roots  
278 respectively. Our result suggests that B[a]P, the high molecular weight PAH, is less  
279 bioavailable than anthracene, a low molecular weight PAH. The difference observed between  
280 anthracene and B[a]P degradation could be attributed to their different physico-chemical  
281 properties. Indeed, PAHs with higher molecular weights and more benzene rings are more  
282 slowly desorbed and less available for biological uptake (Aronstein et al., 1991).

283 Contrarily to the data obtained by Verdin et al. (2006) with anthracene, our results  
284 showed identical B[a]P accumulation in non-mycorrhizal and mycorrhizal roots (Table 1). In  
285 fact, the bioaccumulation factor (BF) calculated as the ratio of PAH concentration in the root  
286 on PAH concentration in the medium, was similar between non-mycorrhizal and mycorrhizal  
287 roots (Table 2). This result is in accordance with the TAG content of mycorrhizal and non-  
288 mycorrhizal which were similar (Table 2).

289 Furthermore, our results showed that B[a]P degradations were also similar in  
290 mycorrhizal and non-mycorrhizal chicory roots. They were estimated to 24 and 26% of the  
291 B[a]P recovered in the abiotic control for mycorrhizal and non-mycorrhizal chicory roots  
292 respectively, demonstrating the root capacity to degrade the B[a]P, a high molecular weight  
293 PAH.

294 On the other hand, contrarily to our results, a significant increase in anthracene  
295 degradation by mycorrhizal than by non-mycorrhizal ones was demonstrated by Verdin et al.  
296 (2006). However, they hypothesized that increased anthracene degradation of mycorrhizal  
297 roots could be due to the higher biomass, whereas in our results, the mycorrhizal and non-  
298 mycorrhizal root biomasses remained constant (result not shown).

299 Two assumptions could be issued to explain the similar degradation between  
300 mycorrhizal and non-mycorrhizal roots. Firstly, the extraradical mycelium grew in a lesser

301 extent in mono-compartmental than in the FC of the bi-compartmental Petri dish. Indeed, it  
302 was demonstrated that the hyphal elongation and the spore number decreased by 2.5 and by  
303 62 folds in mono-compartmental Petri dish by comparison to bi-compartmental Petri dish  
304 (Debiane et al., 2009, 2011) and the mycelium weight could thus be negligible as compared to  
305 the root dry weight. It could thus be hypothesized that the mycelium metabolize B[a]P, but  
306 this fraction is negligible, as compared to the metabolized B[a]P resulted from the roots.  
307 Secondly, a lower reactive oxygen species (ROS) accumulation in mycorrhizal roots resulting  
308 from the oxidative stress alleviation (Debiane et al., 2009), could explain the absence of  
309 increased B[a]P degradation by mycorrhizal roots by comparison to non-mycorrhizal roots.  
310 Indeed, Rafin et al. (2006) hypothesized that the B[a]P metabolization by the saprophytic  
311 fungus *Fusarium solani* might result from the fungal ROS generating system.

312

313 3.2. B[a]P dissipation by the AMF *Rhizophagus irregularis*.

314

315 Even B[a]P degradation was found to be similar between non-mycorrhizal and  
316 mycorrhizal chicory roots, the extraradical AMF ability to dissipate the B[a]P was studied for  
317 the first time in the FC of the bi-compartmental Petri dishes in the absence of the roots and the  
318 telluric microflora. Firstly, the abiotic B[a]P losses in the FC were estimated to about 33% of  
319 the initial concentration which is lower to the losses estimated in the mono-compartmental  
320 Petri dish. This result could be explained by less adsorption on the dish due to the reduced  
321 surface in contact with the medium in the FC of the bi-compartmental Petri dish.

322 The residual B[a]P recovered in the FC of the bi-compartmental Petri dish was  
323 estimated to about 88% of the abiotic control. The B[a]P dissipation by *Rhizophagus*  
324 *irregularis* was, then, estimated to 12% of the B[a]P quantity recovered in abiotic control  
325 after 12 weeks of culture. According to the ratio B[a]P quantity per mg of dry weight, the

326 B[a]P dissipation by the AMF was about 22.5 times higher than by mycorrhizal and non-  
327 mycorrhizal roots, suggesting the ability of the AMF to dissipate PAHs.

328 Amongst the dissipated B[a]P by the AMF, the B[a]P bioaccumulation in the  
329 extraradical mycelium represented 7% of the recovered B[a]P quantity in the abiotic medium.  
330 According to B[a]P bioaccumulation by mg of dry weight, the bioaccumulation in the AMF  
331 was about 153 and 230 times higher than in the mycorrhizal and the non-mycorrhizal roots  
332 respectively. This result indicated that the AMF accumulated more B[a]P than chicory roots.  
333 The result was confirmed by the BF (calculated as the ratio of B[a]P concentration in the  
334 AMF on B[a]P concentration in the medium), which reached 7, whereas it was estimate to  
335 about 0.04 and 0.03 in the non-mycorrhizal and mycorrhizal roots. Verdin et al. (2006)  
336 demonstrated that anthracene was bioaccumulated in the lipid bodies in the AMF mycelium.  
337 These lipid bodies consist of spheroidal macromolecular assemblies of neutral lipid [usually  
338 triacylglycerol (TAG)] or lipid based polymers that are normally bounded by a phospholipid  
339 monolayer membrane plus a variety of lipid-associated proteins, as reviewed by Murphy  
340 (2012). According to the species, the neutral lipids, mainly composed by TAG represents 80  
341 to 95% of ungerminated spores of various *Glomus* species (Beilby and Kidby, 1980; Jabaji-  
342 Hare, 1988; Gaspar et al., 1994), leading Gaspar et al. (1994) to consider the AMF as  
343 'oleaginous fungi'. Moreover, Gao and Zhu (2004) pointed out a positive correlation between  
344 lipid content and PAHs concentrations in the roots. So the high BF in the AMF could be  
345 correlated with the lipid content of the AMF. Indeed, our results showed that the TAG content  
346 in the AMF *Rhizophagus irregularis* was 6 and 4 folds higher than in non-mycorrhizal and  
347 mycorrhizal roots respectively.

348 The AMF being able to bioaccumulate PAHs in the lipid bodies in the external  
349 mycelium (Verdin et al., 2006), it could reduce the bioavailable quantities for the roots in  
350 polluted soils. Indeed, AMF hyphal extension increases the surface area of root-soil contact

351 and was estimated between 81 and 111 m/cm<sup>3</sup> (Miller et al., 1995) and this important external  
352 mycelium may thus contribute in the stabilization/sequestration of PAHs in the soil, as it was  
353 suggested by Alarcón et al. (2006).

354 On the other hand, even the extraradical mycelium bioaccumulated PAHs in lipid  
355 bodies which could move along hyphae (Bago et al., 2002), no B[a]P was detected in the  
356 mycorrhizal chicory roots grown in the RC of the bi-compartmental Petri dish in our  
357 experimental conditions (results not shown). This result suggests no B[a]P transfer to the host  
358 roots or a little translocation, which was not detected with our experimental analyses.  
359 Contrarily to our results, it was demonstrated that PAHs were transferred to the mycorrhizal  
360 roots, after sampling by external mycelium grown in compartmental rhizoboxes, (Gao et al.,  
361 2010; Wu et al., 2011). However, these authors tested lower molecular weight PAHs than  
362 B[a]P: fluorene, phenanthrene and pyrene (which possess 3 and 4 rings). Gao et al. (2010)  
363 suggested that smaller PAH with higher water solubility is more readily transferred by AMF  
364 hyphae to roots and then to shoots along the transpiration stream. Our results hypothesized  
365 that B[a]P, which possesses 5 rings, could thus be less readily transferred in the host roots  
366 than lower molecular weight PAHs.

367 Beside the bioaccumulation, B[a]P degradation by *Rhizophagus irregularis* was  
368 estimated to about 5% residual B[a]P in the abiotic control in our culture conditions. This  
369 degradation percentage is relatively lower than those obtained with saprophytic fungi as  
370 *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma viride*, which degraded 58, 30 and  
371 50% of the initial B[a]P added in the culture medium, after 30 days (Verdin et al., 2004).  
372 Moreover, 12 strains of white-rot fungi were tested for B[a]P biodegradation and the lowest  
373 and the highest B[a]P concentration degraded was estimated to about 10% and 80%  
374 respectively of the residual B[a]P in the abiotic control after 28 days (Field et al., 1992).

375           Whereas the B[a]P degradation percentage compared with the initial concentration  
376 introduced in the culture medium was lower in the AMF than in the roots, the ratio degraded  
377 B[a]P (in  $\mu\text{g}$ ) per mg of fungal dry weight was 10 folds higher than in the roots. This result  
378 suggested the ability of the AMF to degrade the PAH. The AMF not only enhance the  
379 degradation performed by the roots and the rhizospheric microflora but could also directly  
380 metabolize PAHs.

381  
382 3.3. Detection and identification of B[a]P metabolites extracted from the mycorrhizal, the  
383 non-mycorrhizal chicory roots and the AMF.

384  
385           B[a]P degradation was checked by isolating metabolic products extracted from the  
386 symbionts. The same metabolite was detected in the culture of mycorrhizal, non-mycorrhizal  
387 chicory roots and the AMF extraradical mycelium after incubation in the presence of B[a]P  
388 (Table 3). The structure of this metabolite was identified, using GC-MS, and the mass  
389 spectrum contained a base peak at 149 m/z (Fig. 2a), corresponding to the base peak of the  
390 phthalate esters (monobutyl or dibutyl phthalate) (Fig. 2b,c). The phthalate production could  
391 not be the result of manipulation artifact because this metabolite was not detected in the  
392 abiotic control, as shown on Fig. 1a and in the roots grown in the absence of B[a]P (control)  
393 (Fig. 1b). The chromatographs of the extracts originating from mycorrhizal, non-mycorrhizal  
394 roots and the AMF extraradical mycelium (Fig 2c,d,e) showed a concomitant increase of the  
395 metabolite peak with B[a]P depletion.

396           Only few investigations reported the formation of PAHs-degradation metabolites by  
397 plants. The B[a]P was reported to be metabolized to quinones and other derivatives in the  
398 presence of *Chenopodium* cell cultures (Harms et al., 1977; Harms et al., 2003). However, no  
399 data are available concerning B[a]P metabolization by the mycorrhiza and the AMF. The

majority of publications concerns PAHs-metabolization by saprophytic fungi as *Penicillium*,  
*Fusarium*, *Crinipellis*, *Cunninghemella* in which PAHs-degradation products were identified as  
quinones and their hydroxylated precursors, sulfates and phthalates (Pothuluri et al., 1992;  
Lange et al., 1994, Lambert et al., 1994; Wunder et al., 1997; Rafin et al., 2006). As reviewed  
by Haritash and Kaushnick (2009), a generalized degradation pathway of PAHs has been  
proposed for saprophytic fungi in different studies. Phthalic derivative is described to be  
produced as one of the ring fission products of PAHs by white-rot fungi and bacteria  
(Crawford and Crawford, 1996; Kottermann et al., 1998). For example, Rehmann et al. (1998)  
and Cajthaml et al. (2002) reported the phthalic derivative production respectively by the  
*Mycobacterium* spp. Strain KR2 degrading pyrene and by the ligninolytic fungus *Irpex*  
*lacteus* degrading anthracene. The phthalate derivative, as B[a]P ring fission products by  
*Fusarium solani* was also observed by Rafin et al. (2006). These authors hypothesized that the  
production of phthalate derivative might result from the fungal ROS generating system.  
Recently, a significant increase in malondialdehyde (MDA, a lipid peroxidation biomarker)  
content was observed in non-mycorrhizal chicory roots and in the AMF *Glomus irregulare*  
grown on B[a]P-supplemented medium, suggesting ROS production in the non-mycorrhizal  
roots and in the extraradical AMF grown under PAHs pollution (Debiane et al., 2009, 2011).  
In non-mycorrhizal roots and in *Rhizophagus irregularis*, the B[a]P-induced oxidative stress,  
could thus result in the B[a]P degradation and metabolization.

On the other hand, MDA content was significantly lower in mycorrhizal roots than in  
non-mycorrhizal ones grown in the presence of B[a]P, indicating that ROS-induced oxidative  
damage was alleviated by unknown direct and indirect mycorrhizal mechanisms, such as  
enzymatic pathways (Debiane et al., 2009). Plant peroxidases are involved in a broad range of  
physiological processes all along the plant life cycle. Due to two possible catalytic cycles,  
peroxidative and hydroxylic, peroxidases can generate ROS and regulate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels

425 (Passardi et al., 2005). In mycorrhizal roots, peroxidase activities were induced by B[a]P  
426 (Debiane et al., 2009). The mycorrhizal colonization could thus allow the plant to control the  
427 production of ROS in order to degrade and metabolize B[a]P to phthalate.

428  
429 In conclusion, our study showed that mycorrhizal and non-mycorrhizal roots are able  
430 to bioaccumulate and to degrade the high molecular weight PAH: B[a]P in the absence of  
431 rhizospheric microorganisms. Moreover, the present results revealed for the first time the  
432 capacity of the AMF *Rhizophagus irregularis* to degrade PAHs. In addition, our work  
433 highlighted the production of a B[a]P-degradation metabolite, a phthalate derivative, which  
434 was accumulated both in the roots and in the AMF. It is suggested that this B[a]P-  
435 metabolization could be the result of an oxidative stress induction and of antioxidative  
436 enzyme activities, as peroxidases, which could induce the B[a]P ring fission and the  
437 production of phthalate derivative. In further experiment, it would be interesting to study the  
438 activity of antioxidative enzymes potentially involved in PAHs-metabolization, as  
439 peroxidases and laccase, in order to understand the involved mechanisms in PAHs-  
440 metabolization pathway by the AMF and the symbiosis in the absence of telluric microflora.

441

#### 442 4. Acknowledgements.

443

444 In this paper, the first position is shared by the two co-authors: D. Debiane and M.  
445 Calonne. The authors wish to thank the Syndicat Mixte de la Côte d'Opale (SMCO) and the  
446 French Ministry of National Education and Research for providing financial supports for M.  
447 Calonne's Ph.D and D. Debiane's theses respectively. The laboratory participates in the  
448 Institut de Recherche en ENvironnement Industriel (IRENI) which is financed by the  
449 Communauté Urbaine de Dunkerque, the Région Nord Pas-de-Calais, the Ministère de

450 l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the CNRS and European Regional  
451 Development Fund (ERDF).

452

### 453 5. References

454

455 Alarcón, A., Delgadillo-Martínez, J., Franco-Ramírez, A., Davies, F.T., Ferrera-Cerrato, R.,  
456 2006. Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and  
457 phytoremediation potentials of *Gigaspora margarita*-*Echinochloa polystachya* symbiosis in  
458 benzo[a]pyrene-polluted substrate. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 22, 39-  
459 47.

460 Aronstein, B.N., Calvillo, Y.M., Alexander, M., 1991. Effect of surfactants at low  
461 concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil.  
462 *Environmental Science and Technology* 25, 1728-1731.

463 Bago, B., Zipfel, W., Williams, R.M., Jun, J., Arreola, R., Lammers, P.J., Pfeffer, P.E.,  
464 Shachar-Hill, Y., 2002. Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular  
465 mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* 128, 108-124.

466 Bécard, G., Fortin, J.A., 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on  
467 Ri-T-DNA transformed roots. *New Phytologist* 108, 211-218.

468 Beilby, J.P., Kidby, D.K., 1980. Biochemistry of ungerminated and germinated spores of the  
469 vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus caledonius*: changes in neutral and polar  
470 lipids. *Journal of Lipid Research* 21, 739-750.

471 Binet, P., Portal, J-M., Leyval, C., 2000a. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in  
472 the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant and Soil* 227, 207-213.

473 Binet, P., Portal, J-M., Leyval, C., 2000b. Dissipation of 3-6-ring polycyclic aromatic  
474 hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 2011-2017.



- 475 Cajthaml, T., Moder, M., Kacer, P., Sasek, V., Popp, P., 2002. Study of fungal degradation  
476 products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass  
477 spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 974, 213-222.
- 478 Cébron, A., Norini, M-P., Beguiristain, T., Leyval, C., 2008. Real-time PCR quantification of  
479 PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram  
480 negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods* 73, 148-  
481 159.
- 482 Cerniglia, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3,  
483 351-368.
- 484 Chiapusio, G., Pujol, S., Toussaint, M.L., Badot, P.M., Binet, P., 2007. Phenanthrene toxicity  
485 and dissipation in rhizosphere of grassland plants (*Lolium perenne* L. and *Trifolium pratense*  
486 L.) in three spiked soils. *Plant and Soil* 294, 103-112.
- 487 Chiou, C.T., Sheng, G., Manes, M., 2001. A partition-limited model for the plant uptake of  
488 organic contaminants from soil and water. *Environmental Science and Technology* 35, 1437-  
489 1444.
- 490 Corgié, S.C., Fons, F., Beguiristain, T., Leyval, C., 2006. Biodegradation of phenanthrene,  
491 spatial distribution of bacterial populations and dioxygenase expression in the  
492 mycorrhizosphere of *Lolium perenne* inoculated with *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 16, 207-  
493 212.
- 494 Crawford, R.L., Crawford, D.L., 1996. *Bioremediation: Principles and Applications*,  
495 Cambridge University Press.
- 496 Debiane, D., Garçon, G., Verdin, A., Fontaine, J., Durand, R., Grandmougin-Ferjani, A.,  
497 Shirali, P., Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2008. *In vitro* evaluation of the oxidative stress and  
498 genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environmental and*  
499 *Experimental Botany* 64, 120-127.

- 500 Debiane, D., Garçon, G., Verdin, A., Fontaine, J., Durand, R., Shirali, P., Grandmougin-  
501 Ferjani, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2009. Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-  
502 induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. *Phytochemistry* 70, 1421-1427.
- 503 Debiane, D., Calonne, M., Fontaine, J., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., Lounès-Hadj  
504 Sahraoui, A., 2011. Lipid content disturbance in the arbuscular mycorrhizal, *Glomus*  
505 *irregulare* grown in monoxenic conditions under PAHs pollution. *Fungal Biology* 115, 782-  
506 792.
- 507 Debiane, D., Calonne, M., Fontaine, J., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., Lounès-Hadj  
508 Sahraoui, A., 2012. Benzo[a]pyrene induced lipid changes in the monoxenic arbuscular  
509 mycorrhizal chicory roots. *Journal of Hazardous Materials* 209-210, 18-26.
- 510 Field, J.A., de Jong, E., Feijoo Costa, G., de Bont, J.A., 1992. Biodegradation of polycyclic  
511 aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied and Environmental*  
512 *Microbiology* 58, 2219-2226.
- 513 Fismes, J., Perrin-Ganier, C., Empereur-Bissonet, P., Morel, J-L., 2002. Soil-to-root transfer  
514 and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial  
515 contaminated soils. *Journal of Environmental Quality* 31, 1649-1656.
- 516 Fontaine, J., Grandmougin-Ferjani, A., Glorian, V., Durand, R., 2004. 24-methyl/methylene  
517 sterols increase in monoxenic roots after colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *New*  
518 *Phytologist* 163, 159-167.
- 519 Gao, Y., Zhu, L., 2004. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and  
520 pyrene in soils. *Chemosphere* 55, 1169-1178.
- 521 Gao, Y., Cheng, Z., Ling, W., Huang, J., 2010. Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae  
522 contribute to the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant roots. *Bioresource*  
523 *Technology* 101, 6896-6901.

- 524 Gao, Y., Li, Q., Ling, W., Zhu, X., 2011. Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soils  
525 contaminated with phenanthrene and pyrene. *Journal of Hazardous Materials* 185, 703-709.
- 526 Gaspar, M.L., Pollero, R.J., Cabello, M.N., 1994. Triacylglycerol consumption during spore  
527 germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of the American Oil Chemists'*  
528 *Society* 71, 449-452.
- 529 Habe, H., Omori, T., 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in  
530 diverse aerobic bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 67, 225-243.
- 531 Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic  
532 hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials* 169, 1-15.
- 533 Harms, H., Dehnen, W., Monch, W., 1977. BaP metabolites formed by plant cells. *Zeitschrift*  
534 *fur Naturforschung Section C Biosciences* 32, 321-326.
- 535 Harms, H., Bokern, M., Kolb, M., Bock, C., 2003. Transformation of organic contaminants by  
536 different plant systems, in: McCutcheon, S.C., Schnoor, J.L. (Eds), *Phytoremediation:*  
537 *Transformation and Control of Contaminants*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, pp. 285-  
538 316.
- 539 Jabaji-Hare, S., 1988. Lipid and fatty acid profiles of some vesicular-arbuscular mycorrhizal  
540 fungi: contribution to taxonomy. *Mycologia* 80, 622-629.
- 541 Joner, E.J., Johansen, A., Loibner, A.P., Dela Cruz, M.A., Szolar, O.H.J., Portal, J-M.,  
542 Leyval, C., 2001. Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and  
543 toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environmental Science*  
544 *and Technology* 35, 2773-2777.
- 545 Joner, E.J., Leyval, C., 2003. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon  
546 (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza.  
547 *Environmental Science and Technology* 37, 2371-2375.

- 548 Juhasz, A.L., Naidu, R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic  
549 hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International*  
550 *Biodeterioration & Biodegradation* 45, 57-88.
- 551 Juhasz, A.L., Britz, M.M., Stanley, G.A., 2003. Degradation of fluoranthene, pyrene,  
552 benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Bulkholderia cepacia*. *Journal of Applied*  
553 *Microbiology* 83, 189-198.
- 554 Kauppi, B., Lee, K., Carredano, E., Parales, R., Gibson, D., Eklund, H., Ramaswamy, S.,  
555 1998. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenasenaphthalene 1,2-dioxygenase.  
556 *Structure* 6, 571–586.
- 557 Kim, S.J., Kweon, O., Freeman, J.P., Jones, R.C., Adjei, M.D., Jhoo, J.W., Edmondson, R.D.,  
558 Cerniglia, C.E., 2006. Molecular cloning and expression of genes encoding a novel  
559 dioxygenase involved in low- and high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon  
560 degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied of Environmental Microbiology*  
561 72, 1045-1054.
- 562 Kolb, M., Harms, H., 2000. Metabolism of fluoranthene in different plant cell cultures and  
563 intact plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 1304-1310.
- 564 Kotterman, M.J.J, Vis, E.H., Field, J.A., 1998. Successive mineralization and detoxification  
565 of Benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55 and indigenous  
566 microflora. *Applied of Environmental Microbiology* 64, 2853-2858.
- 567 Lambert, M., Kremer, S., Sterner, O., Anke, H., 1994. Metabolism of pyrene by the  
568 Basidiomycete *Crinipellis stipitaria* and identification of pyrenequinones and their  
569 hydroxylated precursors in strain JK375. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3597-  
570 3601.

- 571 Lange, B., Kremer, S., Sterner, O., Anke, H., 1994. Pyrene metabolism in *Crinipellis*  
572 *stipitaria*: identification of trans-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene and 1-pyrenylsulfate in  
573 strain JK364. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3602-3607.
- 574 Liste, H-H., Alexander, M., 2000. Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere*  
575 40, 7-10.
- 576 Liu, S.L., Luo, Y.M., Cao, Z.H., Wu, L.H., Ding, K.Q., Christie, P., 2004. Degradation of  
577 benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environmental Geochemistry and*  
578 *Health* 26, 285-293.
- 579 Liu, A., Dalpé, Y., 2009. Reduction in soil polycyclic aromatic hydrocarbons by arbuscular  
580 mycorrhizal leek plants. *International Journal of Phytoremediation* 11, 39-52.
- 581 Maliszewska-Kordybach, B., 2005. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in  
582 freshly contaminated soils - The effect of soil physicochemical properties and aging. *Water,*  
583 *Air and Soil Pollution* 168, 113-128.
- 584 Manahan, S.E., 1994. *Environmental Chemistry*, sixth ed. Lewis Publisher, New York.
- 585 Mastrangelo, G., Fadda, E., Marzia, V., 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer  
586 in man. *Environmental Health Perspectives* 104, 1166-1170.
- 587 Miller, R.M., Reinhardt, D.R., Jastrow, J.D., 1995. External hyphal production of vesicular-  
588 arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia* 103, 17-  
589 23.
- 590 Mueller, K.E., Shann, J.R., 2006. PAH dissipation in spiked soil: impacts of bioavailability,  
591 microbial activity, and trees. *Chemosphere* 64, 1006-1014.
- 592 Murphy, D.J., 2012. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to  
593 mammals. *Protoplasma* 249, 541-585.
- 594 Nagahashi, G., Doner, L., Abney, G., Tsao, A., 1993. The low temperature, rapid dissolution  
595 of gellan away from root cultures. *Chemistry and Materials Science* 7, 467-472.

- 596 Nam, K., Kim, J.Y., 2002. Role of loosely bound humic substances and humin in the  
597 bioavailability of phenanthrene aged in soil. *Environmental Pollution* 118, 427-433.
- 598 Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C., 2005. Peroxidases have more functions than a  
599 Swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24, 255-265.
- 600 Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56, 15-39.
- 601 Pothuluri, J.V., Heflich, R.H., Fu, P.P., Cerniglia, C.E., 1992. Fungal metabolism and  
602 detoxification of fluoranthene. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 937-941.
- 603 Rafin, C., Veignie, E., Woisel, P., Cazier, F., Surpateanu, G., 2006. New potential of a  
604 Deuteromycete fungus *Fusarium solani* in benzo[a]pyrene degradation: an eco-physiological  
605 hypothesis?, in: Glaze, M.P. (Ed.), *New Frontiers in Environmental Research*. Nova Science  
606 Publishers, Inc, New York, pp. 165-179.
- 607 Rehmann, K., Noll, H.P., Steiberg, C.E.W., Kettrup, A.A., 1998. Pyrene degradation by  
608 *Mycobacterium* sp. Strain KR2. *Chemosphere* 36, 2977-2992.
- 609 Reilley, K.A., Banks, M.K., Schwab, A.P., 1996. Dissipation of polycyclic aromatic  
610 hydrocarbons in the rhizosphere. *Journal of Environmental Quality* 25, 212-219.
- 611 Rugh, C.L., 2004. Genetically engineered phytoremediation: one man's trash is another man's  
612 transgene. *Trends in Biotechnology* 22, 496-498.
- 613 Sabaté, J., Viñas, M., Solanas, A.M., 2006. Bioavailability assessment and environmental fate  
614 of polycyclic aromatic hydrocarbons in biostimulated creosote-contaminated soil.  
615 *Chemosphere* 63, 1648-1659.
- 616 Samanta, S.K., Singh, O.V., Jain, R.K., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons:  
617 environmental pollution and bioremediation. *Trends in biotechnology* 20, 243-248.
- 618 Schüßler, A., Walker, C., 2010. The *Glomeromycota*. A species list with new families and  
619 new genera. p 56.

- 620 Simonich, S.L., Hites, R.A., 1995. Organic pollutant accumulation in vegetation.  
621 Environmental Science and Technology 29, 2905-2914.
- 622 Smith, S.E., Read, D.J., 2008. Mycorrhizal Symbiosis, third ed. Academic Press, San Diego.
- 623 St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., Fortin, J.A., 1996. Enhanced hyphal  
624 growth and spore production of the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an  
625 *in vitro* system in the absence of host roots. Mycological Research 100, 328-332.
- 626 Sun, T-R., Cang, L., Wang, Q-Y., Zhou, D-M., Cheng, J-M., Xu, H., 2010. Roles of abiotic  
627 losses, microbes, plant roots, and root exudates on phytoremediation of PAHs in a barren soil.  
628 Journal of Hazardous Materials 176, 919-925.
- 629 Sun, M., Fu, D., Teng, Y., Shen, Y., Luo, Y., Li, Z., Christie, P., 2011. In situ  
630 phytoremediation of PAH-contaminated soil by intercropping alfalfa (*Medicago sativa* L.)  
631 with tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and associated soil microbial activity. Journal  
632 of Soils and Sediments 11, 980-989.
- 633 Susarla, S., Medina, V.F., McCutcheon, S.C., 2002. Phytoremediation: an ecological solution  
634 to organic chemical contamination.
- 635 Verdin, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Durand, R., 2004. Degradation of benzo[a]pyrene by  
636 mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. International Biodeterioration &  
637 Biodegradation 53, 65-70.
- 638 Verdin, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Newsam, R., Robinson, G., Durand, R., 2005.  
639 Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles.  
640 Environmental Pollution 133, 283-291.
- 641 Verdin, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Fontaine, J., Grandmougin-Ferjani, A., Durand, R.,  
642 2006. Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and  
643 contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. Mycorrhiza 16, 397-405.

- 644 Watts A.W., Ballester, T.P., Gardner, K.H., 2006. Uptake of polycyclic aromatic  
645 hydrocarbons (PAHs) in salt marsh plants *Spartina alterniflora* grown in contaminated  
646 sediments. *Chemosphere* 62, 1253-1260.
- 647 Wei, S., Pan, S., 2010. Phytoremediation for soils contaminated by phenanthrene and pyrene  
648 with multiple plant species. *Journal of Soils and Sediments* 10, 886-894.
- 649 Wu, N., Zhang, S., Huang, H., Christie, P., 2008. Enhanced dissipation of phenanthrene in  
650 spiked soil by arbuscular mycorrhizal alfalfa combined with a non-ionic surfactant  
651 amendment. *Science of the Total Environment* 394, 230-236.
- 652 Wu, F.Y., Yu, X.Z., Wu, S.C., Lin, X.G., Wong, M.H., 2011. Phenanthrene and pyrene  
653 uptake by arbuscular mycorrhizal maize and their dissipation in soil. *Journal of Hazardous*  
654 *Materials* 187, 341-347.
- 655 Wunder, T., Marr, J., Kremer, S., Sterner, O., Anke, H., 1997. 1-methoxypyrene and 1,6-  
656 dimethoxypyrene: two novel metabolites in fungal metabolism of polycyclic aromatic  
657 hydrocarbons. *Archives of Microbiology* 167, 310-316.
- 658 Yu, X.Z., Wu, S.C., Wu, F.Y., Wong, M.H., 2011. Enhanced dissipation of PAHs from soil  
659 using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. *Journal of Hazardous Materials* 186,  
660 1206-1217.



Table 1: Residual, dissipated, accumulated and degraded B[a]P [quantity ( $\mu\text{g}/\text{Petri dish}$ ) and in percentage of residual B[a]P concentration in the abiotic control and by biological material dry weight ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )] in the culture of non-mycorrhizal (NMR), mycorrhizal (MR) chicory roots after 12 weeks of growth in mono-compartmental Petri dish and in the culture of the AMF *Rhizophagus irregularis* after 9 weeks of growth in bi-compartmental Petri dish in the presence of B[a]P at 280  $\mu\text{M}$ . Data of B[a]P quantities represent means  $\pm$  SD of 5 values. The different letters indicate a significant difference between the MR, the NMR and the AMF, as determined by ANOVA followed by a multiple range test (LSD) ( $p \leq 0.05$ ) in the column containing the B[a]P quantity/biological material dry weight ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). The absence of \* indicates no difference between non-mycorrhizal chicory roots and mycorrhizal chicory roots as determined by the Mann-Whitney U test ( $p \leq 0.05$ ), in the column quantity ( $\mu\text{g}/\text{Petri dish}$ ).

	Quantity ( $\mu\text{g}/\text{Petri dish}$ )	%	B[a]P quantity/biological material dry weight ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	
B[a]P concentration after incubation in the abiotic mono-compartmental Petri dish				
	1041.4 $\pm$ 167.8			
NMR	Residual B[a]P in the culture medium	750.8 $\pm$ 56.3	72	10.2 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
	B[a]P dissipation	290.6 $\pm$ 56.6	28	4 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
	B[a]P bioaccumulation in the roots	22 $\pm$ 4	2	0.3 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
	B[a]P degradation by the roots	268.6 $\pm$ 56.3	26	3.7 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
MR	Residual B[a]P in the culture medium	775.6 $\pm$ 44	74	11.7 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
	B[a]P dissipation	265.7 $\pm$ 44	26	4 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
	B[a]P bioaccumulation in the roots	16.5 $\pm$ 8	2	0.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
	B[a]P degradation by the roots	254.2 $\pm$ 41.6	24	3.8 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
B[a]P concentration after incubation in the abiotic bi-compartmental Petri dish				
	1638.8 $\pm$ 13.2			
AMF	Residual B[a]P in the culture medium	1 441 $\pm$ 55.6	88	650.9 $\pm$ 59.8 <sup>b</sup>
	B[a]P dissipation	197.7 $\pm$ 55.6	12	90 $\pm$ 28.9 <sup>b</sup>
	B[a]P bioaccumulation in the fungus	116.5 $\pm$ 56.5	7	46 $\pm$ 11.2 <sup>b</sup>
	B[a]P degradation by the fungus	81.2 $\pm$ 55.6	5	37.4 $\pm$ 25.8 <sup>b</sup>

Table 2. Comparison of bioaccumulation factor (BF) and triacylglycerol (TAG) quantity ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  of dry weight) between non-mycorrhizal (NMR), mycorrhizal (MR) chicory roots and the AMF *Rhizophagus irregularis*. Data represent means  $\pm$  SD of 5 values. Different letters indicate a significant difference between the different biological materials, as determined by ANOVA followed by a multiple range test (LSD) ( $p \leq 0.05$ ).

	NMR	MR	AMF
BF	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.03 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	6.89 $\pm$ 1.68 <sup>b</sup>
TAG quantity ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight)	6.7 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	9.8 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	43.2 $\pm$ 7.4 <sup>b</sup>

Table 3. Detection of phthalate (identified by GC-MS) in non-mycorrhizal (NMR, mycorrhizal (MR) chicory roots and in the AMF *Rhizophagus irregularis*, in the absence (control) or in the presence of B[a]P.

n.d.: not detected.

+: peak area about 518.7

++: peak area about 1341.6

	<b>Control</b>	<b>B[a]P</b>
NMR	n.d.	++
MR	n.d.	++
AMF	n.d.	+

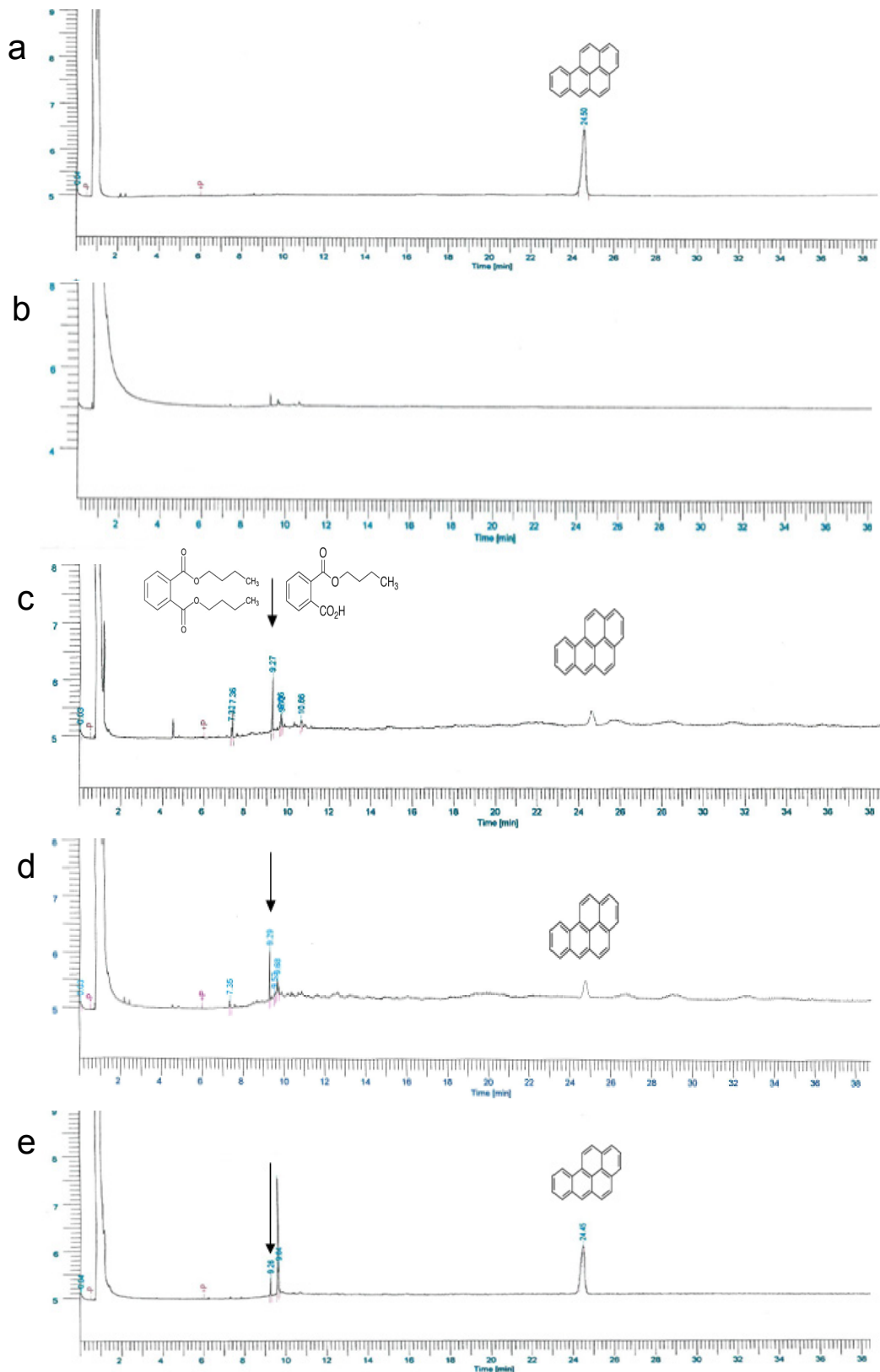


Figure 1. Chromatographs of B[a]P and phthalates in abiotic control medium in mono-compartmental Petri dish (a); in mycorrhizal chicory roots grown in the absence of B[a]P (b); in non-mycorrhizal chicory roots (c); in mycorrhizal chicory roots (d); in the AMF *Rhizophagus irregularis* (e) analyzed by GC-MS. The black narrow indicates the peak corresponding to the B[a]P degrading metabolite.

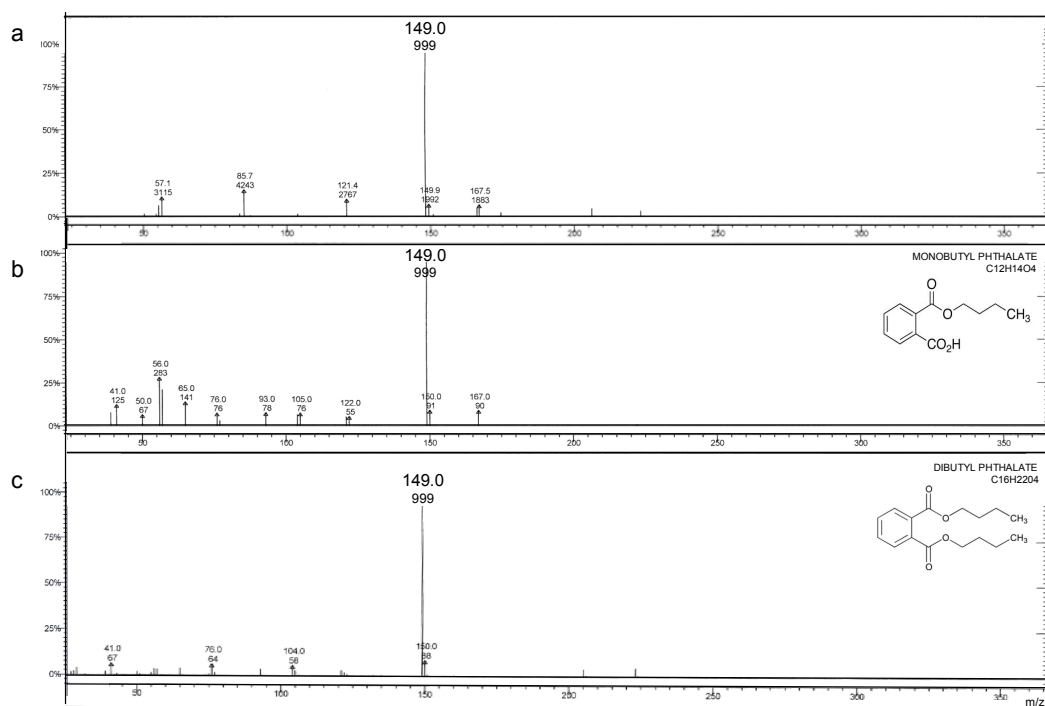


Figure 2. (a) Mass spectrum of the peak corresponding to the B[a]P biodegradation identified on chromatographs and corresponding to the samples analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. (b) and (c) Mass spectra corresponding to the monobutyl phthalate and the dibutyl phthalate respectively.



## Principaux résultats

Tout d'abord, notre étude, toujours réalisée dans des conditions de cultures monoxéniques, a montré que les racines de chicorée, qu'elles soient mycorhizées ou non, sont capables de dissiper un HAP lourd, le B[a]P, en absence de toute flore tellurique. Cette dissipation est due d'une part à la bioaccumulation et d'autre part à la biodégradation du B[a]P. Ce résultat complète la précédente étude menée à l'UCEIV par Verdin et al. (2006) en montrant que non seulement les racines de chicorée peuvent bioaccumuler et dégrader les HAPs de faible poids moléculaire, comme l'anthracène, mais également ceux de haut poids moléculaire, comme le B[a]P. Cependant, les quantités de B[a]P bioaccumulé sont plus faibles que celles estimées pour l'anthracène (Verdin et al., 2006) probablement à cause de sa plus faible biodisponibilité. De plus, contrairement aux résultats obtenus avec l'anthracène, les taux de B[a]P bioaccumulé et de B[a]P biodégradé sont identiques entre racines mycorhizées et non mycorhizées.

Dans ce travail, il a été également étudié, pour la première fois, le rôle direct du CMA dans la dissipation du B[a]P grâce au système de boîtes bi-compartmentées. Nos résultats montrent que non seulement le CMA possède une capacité de bioaccumulation du B[a]P supérieure à celle des racines, mycorhizées ou non, mais il est également capable de le dégrader. En effet, le facteur de bioaccumulation du CMA a été estimé à 7 contre des valeurs de l'ordre de 0,03 et 0,04 respectivement pour les racines mycorhizées et non mycorhizées. Nos travaux mettent en évidence une bonne corrélation entre la teneur en TAG du CMA et des racines ainsi que leur capacité à bioaccumuler le B[a]P. Ceci est en accord avec les résultats de Verdin et al. (2006) qui ont démontré, grâce à l'utilisation d'un colorant spécifique des lipides (le soudan III) et à la propriété d'autofluorescence des HAPs, le stockage des HAPs dans les globules lipidiques des structures fongiques (spores, mycélium) et racinaires.

Enfin, la dégradation du B[a]P par les deux partenaires de la symbiose mycorhizienne a été démontrée par la détection et l'identification en GC-MS d'un métabolite intermédiaire issu de la métabolisation du B[a]P: l'ester de phtalate (un monobutyl- ou un dibutyl-phtalate).

*En résumé, l'ensemble de nos résultats montrent que non seulement les racines sont capables de dissiper le B[a]P, HAP de haut poids moléculaire, par bioaccumulation et biodégradation, mais que le CMA aussi possède cette capacité de stockage et de métabolisation du B[a]P. En effet, il a été montré à travers cette étude que la dégradation du*

*B[a]P conduit à la formation d'un métabolite intermédiaire identifié comme étant un dérivé de phtalate, décrit et identifié chez d'autres groupes de champignons dégradant les HAPs. Cependant, les mécanismes éventuels impliqués dans cette métabolisation du B[a]P sont discutés dans le présent travail.*

# Chapitre IV

---

Discussion

-

Conclusion générale

-

Perspectives





# Discussion

-

## Conclusion générale

---

L'accumulation des HAPs dans les sols suite à des rejets d'origine principalement anthropique pose un véritable problème en raison de leur toxicité avérée pour l'Homme et les autres composantes des différents écosystèmes. C'est pourquoi, leur élimination des sols s'impose.

Parmi les techniques de remédiation des sols pollués par les HAPs, la phytoremédiation assistée par les CMA fait partie des bio-procédés innovants, respectueux de l'Homme et de son environnement, les plus adaptés à ce type de polluants organiques persistants caractérisés par une grande hydrophobicité et une faible dégradabilité. En effet, la mycorhization des plantes par les CMA présentent de nombreux atouts dont (i) une amélioration de la nutrition hydrique et minérale des plantes grâce au développement d'un réseau mycélien permettant l'exploration d'un volume de sol beaucoup plus important, (ii) une atténuation de la phytotoxicité des polluants grâce à l'aptitude des CMA à stimuler les défenses des plantes contre les stress abiotiques, et (iii) une meilleure capacité de dissipation des polluants en favorisant notamment le développement de la flore rhizosphérique dégradante.

Dans ce contexte, des travaux antérieurs réalisés au sein de l'UCEIV ont montré que la mycorhization arbusculaire apporte une meilleure tolérance des plantes mycorhizées aux HAPs en atténuant le stress oxydant et notamment en limitant les dommages membranaires et génomiques (Debiane et al., 2008, 2009, 2012) mais aussi améliore la dissipation de l'anthracène (Verdin et al., 2006).

Cependant, il a également été démontré que les HAPs pouvaient avoir un impact négatif sur les principaux stades du cycle de développement des CMA (germination, colonisation racinaire, élongation hyphale extra-racinaire et sporulation). Cette toxicité a été attribuée à l'induction d'un stress oxydant (mis en évidence par la production accrue de MDA, marqueur de peroxydation lipidique et de 8-OHdG, marqueur d'altération génomique) et également à des dommages sur les lipides membranaires fongiques. En effet, les résultats obtenus par Debiane et al. (2011) à l'UCEIV ont montré des diminutions significatives des quantités totales en stérols (principalement le 24-méthylcholestérol et le 24-éthylcholestérol)

et de la teneur en PC, le PL majeur chez *Glomus irregulare* DAOM 197198, suggérant soit une dégradation accrue de ces composés en présence de l'anthracène et du B[a]P, soit une diminution de sa biosynthèse. La PC est par ailleurs un des substrats possibles des AG désaturases, enzymes liées aux membranes (Gurr et al., 2002).

Cependant, à notre connaissance, ni les cibles d'action des HAPs (en particulier au niveau du métabolisme lipidique), ni la signification de ces modifications lipidiques (principalement quantitatives) au niveau du CMA ne sont clairement définis. Plusieurs questions restent posées quant à ces observations. S'agit-il d'un effet direct de la toxicité sur le CMA? ou alors d'une réponse du CMA pour se protéger contre la toxicité des HAPs? ou encore des modifications en relation avec les mécanismes de dissipation des HAPs?

Par ailleurs, étant donné l'impact des HAPs sur la croissance des CMA (Debiane et al., 2011), on peut supposer que ces dommages au niveau des lipides membranaires puissent avoir des conséquences diverses au niveau du fonctionnement cellulaire dont un dysfonctionnement membranaire (comme par exemple une perturbation de la fluidité membranaire et/ou une inactivation de certaines enzymes associées aux membranes), elles-mêmes pouvant avoir des répercussions néfastes sur les mécanismes essentiels de la symbiose, notamment la nutrition minérale phosphatée.

C'est ainsi que les travaux de la présente thèse se sont inscrits dans le cadre de cette problématique et visent à étudier :

1. l'impact des HAPs sur le métabolisme lipidique du CMA grâce à des expériences de radiomarquage par un précurseur de la biosynthèse des lipides, l'acétate [ $1-^{14}\text{C}$ ],
2. le transport du P par le CMA du milieu de culture vers les racines en présence des HAPs.
3. la dissipation du B[a]P, HAP lourd, par les deux partenaires de la symbiose mycorhizienne et en particulier l'implication directe du CMA dans la dégradation du B[a]P.

Afin de tenter de répondre à ces trois objectifs, trois expériences originales ont été mises en œuvre en utilisant des cultures *in vitro* (en systèmes de boîtes mono- et bi-compartmentées) avec l'anthracène et le B[a]P, comme deux HAPs modèles de faible et de haut poids moléculaire respectivement.

## I. Impact des HAPs sur le métabolisme des lipides membranaires

### I.1. Les stérols

En 2011, Debiane et al. ont constaté une chute de la teneur des stérols de fin de chaîne, le 24-méthylcholestérol et le 24-éthylcholestérol, chez le CMA *Glomus irregulare* DAOM 197198 en présence des HAPs. Toutefois, l'origine de cette diminution des stérols n'a pas été déterminée. Grâce à une expérience de radiomarquage utilisant comme précurseur des lipides, de l'acétate [ $1-^{14}\text{C}$ ] introduit dans le compartiment fongique des boîtes bi-compartmentées, nous avons montré que le mycélium extra-racinaire cultivé en présence d'HAPs présente une plus faible incorporation de l'acétate [ $1-^{14}\text{C}$ ] dans les  $4\alpha$ -méthylstérols (précurseurs stéroliques) et les stérols de fin de chaîne, les 4-déméthylstérols. Ce résultat suggère un ralentissement de la voie de biosynthèse des stérols chez le CMA en aval des 4,4-diméthylstérols (précurseur stérolique) en présence des HAPs, expliquant ainsi la chute de la quantité des 4-déméthylstérols et par conséquent une origine possible de l'inhibition du développement fongique de *Glomus irregulare* DAOM 197198 observée par Debiane et al. (2011). Une corrélation entre l'inhibition de la biosynthèse des stérols et des modifications morphologiques a été montrée chez différents groupes de champignons, comme *Penicillium italicum* ou *Candida albicans* (Kerkenaar et al., 1984a,b; Martin et Konopka, 2004; revue de Mysyakina et Funtikova, 2007). En effet, en plus de leur rôle structural, les stérols possèdent un rôle important dans la fluidité des membranes et dans leur perméabilité (Weete, 1989).

### I.2. Les phospholipides (PL)

Les résultats obtenus précédemment par Debiane et al. (2011) ont démontré l'induction d'un stress oxydant par les HAPs mis en évidence par une importante production de MDA, ainsi que la chute significative de PC, le PL majoritaire chez *Glomus irregulare* DAOM 197198. Ces résultats ont permis d'émettre deux hypothèses: soit que les HAPs engendrent une dégradation accrue de la PC chez le CMA, soit qu'ils provoquent une diminution de sa biosynthèse.

Dans notre étude, des diminutions concomitantes entre l'incorporation de l'acétate marqué dans les PL totaux et la teneur totale de ces composés ont été observées dans le mycélium extra-racinaire du CMA cultivé en présence d'HAPs. De même, pour la PG, un

ralentissement de la biosynthèse en même temps qu'une chute de sa teneur dans le mycélium extra-racinaire du CMA ont été observés.

Au contraire, une incorporation accrue de l'acétate [ $1-^{14}\text{C}$ ] a été observée dans le mélange (PC+PS) (non séparés dans nos conditions d'analyses), suggérant une activation de la voie de biosynthèse de ces PL. De plus, nos résultats ont montré une chute de la quantité de PC, corroborant les travaux décrits par Debiane et al. (2011). Ces résultats suggèrent une activation de la voie de biosynthèse de la PC, probablement, dans le but de compenser la chute de la teneur de ce PL, résultant elle-même en partie de la peroxydation lipidique causée par le stress oxydant induit par les HAPs chez ce CMA (Debiane et al., 2011).

## II. Impact des HAPs sur le transport du P par le CMA vers les racines

Etant donné l'impact des HAPs sur la croissance des CMA résultant des altérations membranaires (notamment les stérols et les PL) dues à des perturbations au niveau du métabolisme lipidique, des conséquences sur le fonctionnement du CMA, en particulier, sur son implication dans le transport du P, l'un des bénéfices majeurs de la symbiose mycorhizienne, a été recherchée.

C'est ainsi que dans notre expérience, le transport du P par le CMA vers les racines après ajout de  $^{33}\text{P}$  dans le compartiment fongique des boîtes bi-compartimentées a été évalué en présence des HAPs. Une chute de la quantité de  $^{33}\text{P}$  retrouvée dans les racines a été mesurée attestant d'une altération du transport du P par le CMA vers les racines.

Nos résultats indiquent qu'au bout de 6 semaines de culture, le prélèvement par les hyphes extra-racinaires du CMA et la translocation jusque dans les hyphes intra-racinaires ne semblent pas être affectés par les HAPs. Plusieurs arguments sont en faveur de cette hypothèse :

- 1- Les activités phosphatases alcalines dosées dans le mycélium extra-racinaire du CMA sont identiques que celui-ci soit cultivé en absence ou en présence d'HAPs,
- 2- Aucun changement dans l'expression des gènes *GiALP* (codant pour une famille de phosphatase alcaline) et *GiPT* (codant pour un transporteur de P) n'a été mesuré. Cependant, rappelons que ces mesures d'expression des gènes ont été réalisées après 6 semaines de contact entre le CMA et les HAPs. Ce temps d'incubation semble être trop long pour observer un changement dans l'expression des gènes et il est possible

que ce changement ait eu lieu plus précocement, durant les premières heures ou les premiers jours d'élongation hyphale en présence des HAPs, puis que le CMA se soit adapté à la présence des polluants.

- 3- La quantité de  $^{33}\text{P}$  résiduelle dans le compartiment fongique est similaire dans les milieux contenant ou pas les HAPs,
- 4- Le nombre de BAS par cm d'hyphes est le même avec ou sans HAPs.

Ce résultat est en accord avec celui d'Ezawa et al. (2004) qui ont démontré que l'absorption de P et la biosynthèse des poly-P dans le CMA sont très rapides. Ils suggèrent que le facteur limitant à la délivrance de P à la plante est le transport à l'hôte végétal.

D'autre part, il semblerait que la chute de la quantité de P dans les racines ne soit pas le résultat d'une altération du transport du P du mycélium extra- vers le mycélium intra-racinaire puisque le nombre total d'hyphes traversant la paroi entre les deux compartiments de la boîte de Pétri reste identique quel que soit le traitement en HAP appliqué dans le milieu de culture.

Il est également possible que cette réduction de la teneur du  $^{33}\text{P}$  contenue dans les racines soit le résultat d'une inhibition des activités phosphatases acides fongiques dans le mycélium intra-racinaire, au niveau des arbuscules suite à un contact avec les HAPs.

Il est cependant important de noter que ces enzymes seraient affectées dans le mycélium intra-racinaire. Récemment, grâce à l'utilisation de rhizoboîtes, il a été démontré que les HAPs étaient transportés dans les racines mycorhizées, après prélèvement par le mycélium extra-racinaire (Gao et al., 2010; Wu et al., 2011). Par ailleurs, Verdin et al. (2006) ont montré que les HAPs étaient bioaccumulés dans les globules lipidiques des CMA. De plus, Bago et al. (2002a) ont montré que ces structures cellulaires étaient capables de se déplacer dans les hyphes selon un transport bidirectionnel. De ce fait, nous pouvons suggérer que les globules lipidiques chargés d'HAPs puissent se déplacer jusque dans les hyphes intra-racinaires et affecter des enzymes fongiques, telles que l'activité des phosphatases acides.

En outre, cette hypothèse d'inhibition des activités phosphatases acides fongiques concorde avec la quantité de  $^{33}\text{P}$  accumulé dans le mycélium extra-racinaire du compartiment racinaire. En effet, cette inhibition des phosphatases acides fongiques empêcherait l'hydrolyse des poly-P conduisant ainsi à une accumulation de P dans les hyphes du CMA.

### III. Dissipation du B[a]P par les racines, mycorhizées ou non, et le CMA

Bien que les HAPs exercent un impact négatif sur le transport du P par le CMA *Rhizophagus irregularis* vers les racines de chicorée (article 2) et sur le développement des deux partenaires de cette symbiose mycorhizienne, notamment en induisant des altérations au niveau des lipides membranaires résultant d'une perturbation du métabolisme lipidique (article 1, Debiane et al., 2011, 2012), non seulement la colonisation mycorhizienne reste possible mais elle permet l'amélioration de la dissipation des HAPs (Verdin et al., 2006; Debiane et al., 2008, 2009). En effet, grâce à l'utilisation des cultures *in vitro*, des études antérieures au sein de l'UCEIV ont montré une meilleure dissipation de l'antracène (HAP de faible poids moléculaire) par les racines de chicorée colonisées par comparaison à des racines non colonisées par *Glomus intraradices* DAOM 197198, et ce, en l'absence de tout autre microorganisme tellurique. Il a été également démontré que cette dissipation avait deux origines: une bioaccumulation dans les globules lipidiques des racines et du CMA ainsi qu'une biodégradation supposée. Cependant, plusieurs questions sont restées sans réponse: est-ce que des racines de chicorée peuvent dégrader un HAP lourd tel que le B[a]P? Est-ce que la mycorhization améliore comme pour l'antracène la dégradation du B[a]P? Quel est le rôle du CMA dans la dégradation des HAPs? Est-ce un rôle direct *via* une activité métabolique dégradante propre? et/ou un rôle indirect de facilitateur/stimulateur/protecteur des racines en atténuant l'effet phytotoxique des HAPs ou en facilitant leur prélèvement?

#### III.1. Bioaccumulation et biodégradation du B[a]P par les racines de chicorée mycorhizées ou non

Tout d'abord, nos résultats ont montré que les racines de chicorée, qu'elles soient mycorhizées ou non, sont capables de bioaccumuler et de biodégrader le B[a]P, dans les conditions monoxéniques, en absence de la microflore rhizosphérique. Ce résultat est tout à fait inédit, surtout dans le cas du B[a]P, qui est un HAP lourd, puisque la plupart des travaux attribuent la meilleure dissipation des HAPs par les plantes à une stimulation de la croissance des microorganismes telluriques dégradants (bactéries et champignons saprotrophes) et à une modification des communautés microbiennes (Aprill et Sims, 1990; Reilley et al., 1996; Binet et al., 2000a,b, 2001; Joner et al., 2001; Joner et Leyval, 2003).

Cependant, les quantités de B[a]P bioaccumulé sont plus faibles que celles estimées pour l'antracène (Verdin et al., 2006) probablement à cause de sa plus faible biodisponibilité. De plus, contrairement aux résultats obtenus avec l'antracène, les taux de B[a]P bioaccumulé et biodégradé sont identiques que les racines soient mycorhizées ou non-mycorhizées.

Deux hypothèses pourraient être avancées pour expliquer cette similitude entre les quantités de B[a]P dégradée par les racines mycorhizées et non-mycorhizées. Premièrement, la biomasse du champignon étant négligeable par rapport à celle des racines dans les boîtes mono-compartmentées, la contribution du CMA dans la dégradation du B[a]P serait difficilement détectable avec nos méthodes d'analyse des HAPs. Deuxièmement, même si aucune donnée n'est disponible dans la littérature concernant les mécanismes impliqués dans la dégradation des HAPs par les CMA, d'après Rafin et al. (2006), la dégradation du B[a]P chez d'autres groupes de champignons serait liée à la production des ERO. Or Debiane et al. (2009) ont démontré que la mycorhization atténuait le stress oxydant en induisant des activités enzymatiques anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase dans les racines de chicorée. Il en résulte une plus faible quantité d'ERO et donc aucune amélioration de la dégradation du B[a]P dans les racines mycorhizées par rapport aux racines non mycorhizées.

### III.2. Bioaccumulation et biodégradation du B[a]P par le CMA

L'une des originalités de notre travail réside en la recherche de l'implication directe du CMA *Rhizophagus irregularis* dans le catabolisme du B[a]P. Cette étude a été possible grâce à l'utilisation des cultures *in vitro* en boîtes bi-compartmentées. Nos résultats montrent qu'en plus d'une bioaccumulation du B[a]P dans les hyphes extra-racinaires, le mycélium fongique est capable de dégrader le B[a]P. Le facteur de bioaccumulation du CMA a été estimé à 7 contre des valeurs de l'ordre de 0,03 et 0,04 respectivement pour les racines mycorhizées et non mycorhizées. De plus, nos travaux mettent en évidence une bonne corrélation entre la teneur en TAG du CMA et des racines ainsi que leur capacité à bioaccumuler le B[a]P. Ceci est en accord avec les résultats de Verdin et al. (2006) qui ont démontré, grâce à l'utilisation d'un colorant spécifique des lipides (le soudan III) et la propriété d'autofluorescence des HAPs, le stockage des HAPs dans les globules lipidiques des structures racinaires et fongiques (spores, mycélium).



Il est, en effet, connu que les globules lipidiques du CMA contiennent des teneurs élevées en TAG (revue de Murphy, 2012). La bioaccumulation des HAPs étant corrélée avec la teneur en lipides, comme décrit chez les racines de certaines plantes (Gao et Zhu, 2004), le facteur de bioaccumulation plus élevé chez le CMA par rapport aux racines de chicorée semble être lié à la teneur en lipides de réserve plus importante chez le symbiote fongique.

### III.3. Détection et identification d'un métabolite issu de la dégradation du B[a]P

La dégradation du B[a]P par les deux partenaires de la symbiose mycorhizienne a été vérifiée grâce à la recherche des produits de métabolisation du B[a]P.

Un métabolite issu de la dégradation du B[a]P a été identifié chez les deux symbiotes. Grâce à l'utilisation de la GC-MS, ce métabolite dont le spectre de masse montrait un pic principal à 149 m/z a été identifié comme étant un ester de phtalate (un monobutyl- ou un dibutyl-phtalate).

Très peu de travaux ont rapporté la production de métabolites issus de la dégradation des HAPs. En effet, la métabolisation des HAPs par les CMA n'a jamais été décrite dans la littérature. Chez les plantes, seuls les travaux de Harms et al. (1977) ont montré que des cultures cellulaires en suspension de *Chenopodium rubrum* mises en présence de B[a]P radiomarqué étaient capables de le métaboliser en B[a]P-3,6-quinone et B[a]P-1,6-quinone. La métabolisation des HAPs a été surtout étudiée chez les champignons saprotrophes. Les produits de dégradation ont été identifiés comme étant des quinones et leurs précurseurs hydroxylés et des sulfates (Pothuluri et al., 1992; Lange et al., 1994, Lambert et al., 1994; Wunder et al., 1997). Toutefois, des dérivés de phtalates ont été décrits lors de la dégradation de HAPs, dont le B[a]P, par *Mycobacterium* spp. Strain KR2, *Irpex lacteus* et *Fusarium solani* (Rehmann et al., 1998; Cajthaml et al., 2002b; Rafin et al., 2006).

D'après Rafin et al. (2006), la production de dérivés de phtalate pourrait résulter du système de production d'ERO. La métabolisation du B[a]P dans le présent travail pourrait ainsi résulter du système de production de ces ERO, mis en évidence par l'augmentation significative de MDA chez les racines de chicorée non mycorhizées et chez le CMA *Glomus irregulare* DAOM 197198, dans les récents travaux de Debiane et al. (2008, 2009, 2011).

D'autre part, la quantité de MDA, significativement inférieure chez les racines mycorhizées par rapport aux racines non mycorhizées cultivées en présence de B[a]P, semblent indiquer que les dommages oxydatifs causés par les ERO soient atténués par des

mécanismes induits par la colonisation mycorhizienne, comme par exemple l'induction de certains systèmes enzymatiques anti-oxydants (Debiane et al., 2009). En effet, une induction de l'activité des peroxydases par la colonisation mycorhizienne chez les racines de chicorée a été montrée par Debiane et al. (2009). Ces enzymes étant connues pour réguler les niveaux de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Passardi et al., 2005), la colonisation mycorhizienne pourrait donc permettre aux plantes de contrôler la production d'ERO dans le but de métaboliser le B[a]P.

#### **IV. Implication du métabolisme des lipides de réserve dans la lutte contre le stress oxydant et la dégradation des HAPs**

Nos travaux au sein de l'UCEIV ont montré que les HAPs induisent un stress oxydant ainsi qu'une chute des contenus lipidiques membranaires (les stérols et les PL) des deux symbiotes de l'association mycorhizienne (Debiane et al., 2008, 2009, 2011, 2012, article 1). La peroxydation lipidique, révélée par l'accumulation de MDA (Debiane et al., 2008, 2009, 2011) mais aussi la perturbation du métabolisme lipidique chez le CMA cultivé sur milieu additionné avec du B[a]P (article 1) seraient à l'origine de ces altérations membranaires et de la toxicité des HAPs. Pour se protéger contre ces effets délétères, le CMA mettrait en œuvre des stratégies de lutte en métabolisant et/ou en internalisant les HAPs dans des vésicules lipidiques afin de les éliminer et/ou de s'affranchir de leur effet toxique.

Nos résultats présentés dans l'article 1 (chapitre III) ont montré une incorporation accrue de l'acétate [1-<sup>14</sup>C] dans les lipides de réserve, TAG, tandis que leur teneur diminue dans les hyphes extra-racinaires du CMA cultivé en présence d'HAPs. Ces résultats suggèrent une activation de la voie de biosynthèse des TAG chez le CMA extra-racinaire probablement dans le but de compenser leur dégradation active, démontrée par l'induction des activités lipasiques.

L'activation du métabolisme des TAG pourrait ainsi permettre au CMA de lutter contre le stress oxydant induit par les HAPs de deux façons:

- 1- En fournissant des squelettes carbonés et de l'énergie, d'une part, pour la régénération des membranes (altérées en présence des HAPs), comme le suggèrent Gaspar et al. (1994a) et Olsson et al. (1995) et d'autre part pour le prélèvement et/ou la dégradation des HAPs. En effet, différents travaux menés sur divers champignons (Verdin et al., 2005a; Wu et al., 2009; Furuno et al., 2012; Thion et al., 2012), dont les CMA (Verdin et al., 2006) ont montré que les HAPs étaient

bioaccumulés dans les globules lipidiques des cellules fongiques, ce qui pourrait constituer une stratégie de protection pour les champignons eux-mêmes contre la toxicité des HAPs grâce à une séquestration des polluants (Thion et al., 2012). D'autre part, le fait de stocker les HAPs pourrait représenter un état transitoire avant oxydation par les systèmes enzymatiques de détoxification, comme la voie des monooxygénase à cytochrome P450, décrite chez un champignon saprotrophe non ligninolytique, *Fusarium solani* (Verdin et al., 2004, 2005a).

- 2- En activant la voie de production des glucides (Bago et al., 1999; Pfeffer et al., 1999; Lammers et al., 2001), comme le tréhalose, qui est décrit dans la littérature pour jouer un rôle de protection contre les stress biotiques et abiotiques chez les champignons, dont les CMA (Ocón et al., 2007) et la chitine constituant une barrière physique entre le cytoplasme fongique et l'environnement (Bago et al., 1996). Elle pourrait ainsi constituer un moyen de protection du CMA en limitant l'entrée des HAPs dans la cellule fongique pour éviter l'altération des membranes. D'autre part, la dégradation des TAG peut également fournir des squelettes carbonés pour la formation de l'AP. En effet, nos résultats ont montré que l'incorporation de l'acétate [ $1-^{14}\text{C}$ ] dans l'AP est plus élevée en présence d'HAPs. L'AP, précurseur des PL, est également connu pour être un messenger secondaire dans la réponse au stress et ayant notamment pour cible les protéines 14-3-3. Ces dernières étant connues pour être impliquées dans la protection de *Glomus intraradices* DAOM 197198 contre le stress hydrique (Porcel et al., 2006), pourraient permettre au CMA de lutter contre le stress induit par les HAPs.

Les perturbations mises en évidence au niveau du métabolisme des lipides extraracinaires chez *Rhizophagus irregularis* et dans le transport du P sont moins marquées en présence d'anthracène (HAP léger) par comparaison au B[a]P (HAP lourd) indiquant une plus forte toxicité du B[a]P par rapport à l'anthracène vis-à-vis du CMA. Ce qui est en accord avec les travaux de Debiane et al. (2011) qui avaient démontré un effet négatif du B[a]P plus important sur les principales étapes du développement chez *Glomus irregulare* DAOM 197198. Il semble que lorsque la molécule est plus liposoluble (cas du B[a]P), ses effets toxiques soient plus élevés. Cela est probablement lié à une plus grande interaction du B[a]P

avec la membrane cellulaire qui favorise l'apparition de dommages plus importants dans le métabolisme de la cellule fongique.

Enfin, nos résultats ont montré un impact plus important du mélange des deux HAPs modèles sur la colonisation totale, arbusculaire et vésiculaire des racines de chicorée colonisées par *Rhizophagus irregularis* (chapitre III, article 2). Cette observation indique un effet synergique négatif des deux HAPs sur une étape cruciale du cycle de développement des CMA et de l'établissement de la symbiose mycorhizienne.

## V. Conclusion générale

En conclusion, le travail entrepris dans le cadre de cette thèse visait à étudier l'impact des HAPs, polluants organiques persistants fréquemment rencontrés dans les sols pollués, sur le métabolisme lipidique d'un CMA, *Rhizophagus irregularis* cultivé *in vitro*. La conséquence de cette toxicité sur le bon fonctionnement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire a été examinée à travers l'étude du transport du P par le CMA. L'implication du métabolisme lipidique dans la lutte contre le stress oxydant induit par les HAPs et leur dégradation par le CMA a été recherchée.

Grâce à des expériences d'incorporation de l'acétate marqué, nos résultats ont mis en évidence un ralentissement de la voie de biosynthèse des stérols dans le mycélium extraracinaire de *Rhizophagus irregularis* en aval des 4,4-diméthylstérols (Figure 38) expliquant ainsi l'inhibition du développement fongique décrite par Debiane et al. (2011).

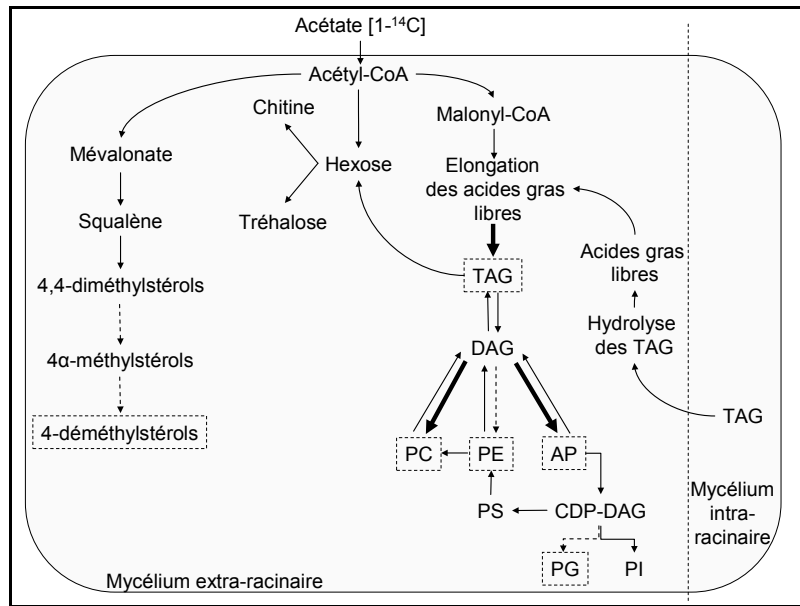
Il a été également montré une activation de la voie de biosynthèse des PL, en particulier la PC (Figure 38), concomitante à une chute dans leur teneur, suggérant un mécanisme de compensation pour palier aux altérations membranaires induites par la peroxydation lipidique observée chez le CMA par Debiane et al. (2011). D'autre part, une activation de la voie de biosynthèse des TAG parallèlement à leur dégradation, mise en évidence par la diminution de leur teneur et l'induction des activités lipasiques, semble permettre au CMA de lutter contre le stress oxydant induit par le B[a]P.

Les résultats obtenus ont également montré que ces dommages membranaires peuvent altérer l'un des bénéfices majeurs de la symbiose mycorhizienne à savoir le transport du P par le CMA du milieu vers la racine (Figure 39). En effet, la quantité de <sup>33</sup>P transférée dans les racines chute lorsque le CMA est cultivé en présence d'HAPs. Les étapes du prélèvement du

P par les hyphes extra-racinaires et la translocation jusque dans les hyphes intra-racinaires ne seraient pas affectées par les HAPs. Le nombre de BAS par cm d'hyphe, la quantité résiduelle de  $^{33}\text{P}$  dans le compartiment fongique, les activités phosphatases alcalines fongiques et l'expression des gènes *GiPT* et *GiALP* restent constants que le mycélium extra-racinaire de *Rhizophagus irregularis* soit cultivé en présence ou en absence d'HAPs. En revanche, il semblerait que ça soit le transfert du P à la plante au niveau de l'interface symbiotique qui soit affecté par les HAPs suite probablement à une inhibition des activités phosphatases acides fongiques.

Bien que les HAPs montrent des effets négatifs sur le développement des deux partenaires de la symbiose mycorhizienne et sur la nutrition phosphatée, non seulement la colonisation mycorhizienne peut s'établir mais elle permet à la fois l'atténuation de la phytotoxicité des polluants en réduisant le stress oxydant induit (Debiane et al., 2008, 2009) et la dissipation du B[a]P. C'est ainsi que nos résultats montrent qu'aussi bien les racines que le CMA sont capables de dissiper le B[a]P, HAP de haut poids moléculaire, par bioaccumulation et biodégradation. Le CMA possède une capacité de stockage du B[a]P supérieure à celle des racines, mycorhizées ou non, corrélée à sa richesse en TAG. Il a été également montré à travers cette étude que la métabolisation du B[a]P par le CMA et les racines de chicorée conduit à la formation d'un métabolite intermédiaire identifié comme étant un dérivé de phtalate, décrit et identifié chez d'autres groupes de champignons dégradant les HAPs. Il est suggéré que cette métabolisation du B[a]P résulterait de la surproduction des ERO et du système enzymatique anti-oxydant mis en œuvre par ces organismes vivants pour lutter contre le stress oxydant induit par les HAPs.

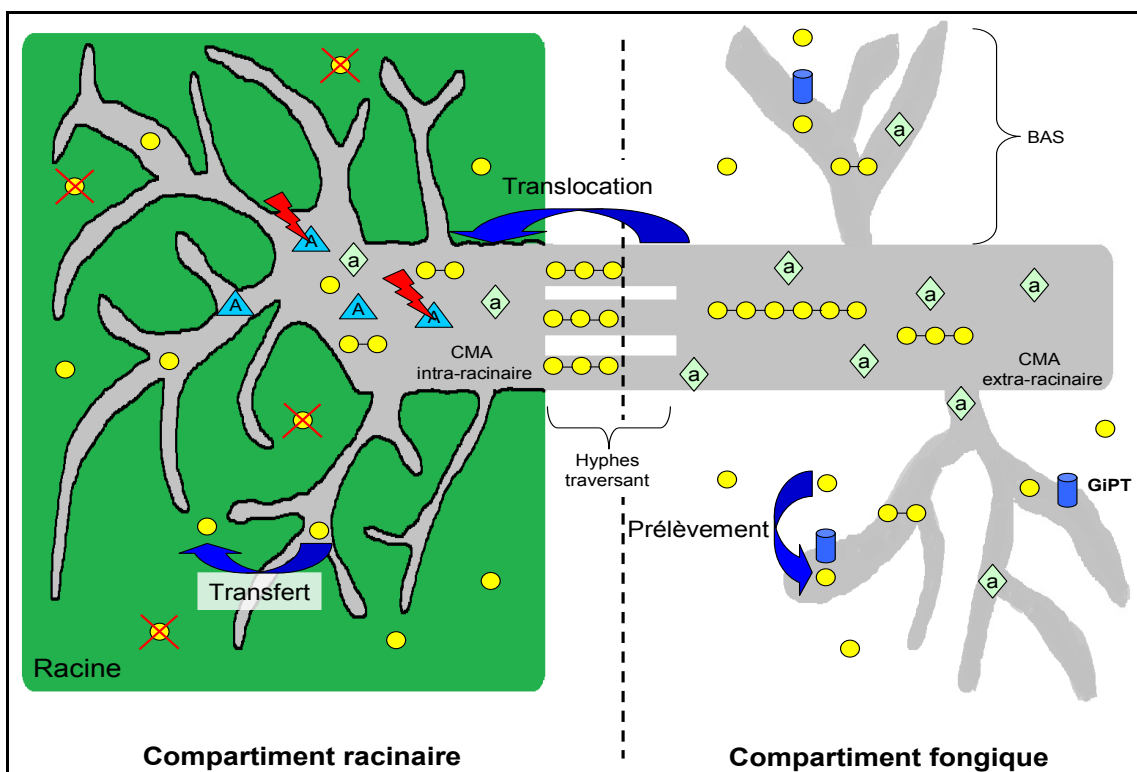
D'après l'ensemble de nos résultats, il semble que le CMA déploie un certain nombre de stratégies de protection en métabolisant et/ou en internalisant les HAPs pour s'affranchir de leurs effets cytotoxiques. En effet, nos expériences suggèrent une activation de la biosynthèse des TAG, les lipides de réserve, probablement pour compenser leur dégradation active (Figure 38), mise en évidence chez le CMA extra-racinaire par l'induction des lipases et la chute de leur teneur. Cette dégradation accrue des TAG pourrait ainsi permettre au CMA de lutter contre le stress induit par les HAPs, en fournissant tout d'abord des squelettes carbonés et de l'énergie pour la régénération des membranes altérées et pour stocker et/ou dégrader les HAPs. Cette hydrolyse des TAG pourrait également permettre de lutter contre le stress en activant la production des glucides et de l'AP, connus pour avoir un rôle protecteur contre les stress abiotiques chez les CMA.



**Figure 38:** Schéma récapitulatif de l'impact des HAPs sur la biosynthèse des lipides dans le mycélium extra-racinaire de *Rhizophagus irregularis*.

- ▶ : chute de l'incorporation de la radioactivité
- ▶▶▶ : augmentation de l'incorporation de la radioactivité
- ▶ : chute de la quantité

CDP-DAG: cytidine-diacylglycérol; DAG: diacylglycérol; AP: acide phosphatidique; PC: phosphatidylcholine; PE: phosphatidyléthanolamine; PG: phosphatidylglycérol; PI: phosphatidylinositol, PL: phospholipides; TAG: triacylglycérols



**Figure 39:** Schéma récapitulatif du transport du P du milieu de culture jusqu'aux racines par le CMA *Rhizophagus irregularis* en présence des HAPs.

- = Phosphore; ●●● = groupements poly-phosphate; ◆a = activités phosphatases alcalines;
- ▲A = activités phosphatases acides; ⚡ = impact des HAPs; — = interface plante-CMA;
- = transporteur GiPT

# Perspectives

---

A l'issue de ce travail, plusieurs questions restent posées. Pour essayer d'y répondre, trois pistes principales de recherche sont proposées:

## **I. Impact des HAPs sur le métabolisme lipidique du CMA**

### I.1. Impact des HAPs sur le lipidome des microdomaines du CMA et de sa plante hôte

Jusque là, nos analyses lipidiques ont porté sur l'étude des lipides totaux du CMA (Debiane et al., 2011, article 1) et de sa plante hôte (Debiane et al., 2012) cultivés en présence d'HAPs. Afin d'affiner les réponses à nos questions et de mieux appréhender les mécanismes de toxicité des HAPs vis-à-vis des deux partenaires de la symbiose mycorhizienne, nous envisageons dans le futur de focaliser nos caractérisations lipidiques sur les microdomaines membranaires, encore appelés « radeaux lipidiques » ou « rafts ». Ce sont des structures membranaires enrichies en stérols et en sphingolipides où se déroulent de nombreux processus cellulaires tels que la signalisation hormonale, les trafics cellulaires (endocytose et exocytose), la polarité et la croissance cellulaire, les réponses aux stress biotiques et abiotiques ainsi que la régulation des échanges trophiques de la symbiose mycorhizienne (Mongrand et al., 2004; revues de Bhat et Panstruga, 2005; Simon-Plas et al., 2011; Doidy et al., 2012). Bien qu'à l'heure actuelle, aucune étude n'ait porté sur les microdomaines des CMA, il a été montré récemment que la formation de ces microdomaines était fonction du degré d'insaturation des acides gras associés aux PL et de la composition stérolique des cellules végétales (Laloi et al., 2007; Roche et al., 2008). On peut supposer que des modifications du contenu lipidique chez le CMA (perturbation des voies de biosynthèse des stérols et des PL et de leurs teneurs), ainsi que chez sa plante hôte, liées à la présence des HAPs, puissent entraver la formation et le fonctionnement de ces structures membranaires fongiques et végétales et ainsi compromettre l'établissement de la symbiose.

Dans ce contexte, les caractérisations qualitatives, quantitatives et fonctionnelles du lipidome membranaire des microdomaines des cellules végétales et fongiques pourraient apporter de nouveaux éléments de réponse quant aux dommages engendrés par les HAPs sur ce lipidome et ainsi sur les mécanismes de leur toxicité. Les microdomaines membranaires

pourront être isolés d'après le protocole décrit par Lefebvre et al. (2007) en collaboration avec le Dr. Françoise Simon-Plas (UMR PME, Dijon). L'extraction des sphingolipides, non réalisée jusque là et leur dosage par CLHP, pourront être effectués en adaptant la méthode décrite par Rombaut et al. (2005) à notre matériel biologique. Bien sûr, les microdomaines étant formés également de protéines, il serait important d'associer cette étude du lipidome à une étude protéomique pour avoir un aperçu complet de l'effet des HAPs sur ces structures membranaires essentielles au bon fonctionnement des cellules.

Par ailleurs, certaines perturbations du contenu lipidique (les stérols et les PL) mises en évidence au niveau de la symbiose mycorhizienne (Debiane et al., 2012) et du CMA sous l'effet des HAPs (Debiane et al., 2011, article 1), suggèrent des dommages au niveau membranaire et une atteinte probable au niveau de la fluidité membranaire. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de comparer la fluidité membranaire dans les hyphes extra-racinaires du CMA en absence et en présence des HAPs (Liang et al., 2006). La perméabilité membranaire pourrait, quant à elle, être évaluée indirectement par la mesure de la conductivité d'une solution avant et après fuite des électrolytes du matériel biologique, selon la méthode décrite par Pinhero et Fletcher (1994).

## I.2. Impact des HAPs sur le métabolisme lipidique intra-racinaire

Même si les connaissances sur le métabolisme lipidique du CMA progressent peu à peu, les données sur ce métabolisme dans le champignon intra-racinaire sont limitées. L'étude du métabolisme lipidique du CMA intra-racinaire ainsi que l'impact des HAPs sur ce métabolisme serait envisageable pour la poursuite de ce travail. Après digestion des racines, les hyphes intra-racinaires pourraient être prélevées selon la méthode décrite par Ezawa et al. (1999).

## I.3. Impact des HAPs sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique

Pour compléter notre étude de l'impact des HAPs sur le métabolisme lipidique du CMA, la mesure, par qRT-PCR, de l'expression des gènes clés impliqués dans le métabolisme lipidique du CMA cultivé en présence d'HAPs pourra être envisagée. A ce jour, les seuls gènes qui ont été clonés chez les CMA sont les gènes codant pour la 4-stérol méthyl oxidase (*GintSMO*) (impliquée dans un processus de déméthylation en C4), l'acétyl-coA ligase



(impliquée dans la biosynthèse des acides gras) et l'acyl-coA déshydrogénase (impliquée dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras) (Bago et al., 2002a; Oger et al., 2009).

L'accès au séquençage du génome de *Rhizophagus irregularis* prochainement, facilitera l'étude de l'expression de gènes codant pour d'autres enzymes clés du métabolisme lipidique telles que l'acide gras synthétase, la  $\omega$ 5-acide gras désaturase ou la stérol 24-méthyltransférase. Ceci pourra permettre de mieux comprendre le mode d'action des HAPs et ainsi de déterminer avec plus de précision leurs cibles d'action enzymatiques au niveau du métabolisme lipidique des CMA.

#### I.4. Interconnexions entre le métabolisme lipidique, le métabolisme glucidique et le stress oxydant induit par les HAPs dans le mycélium extra-racinaire du CMA?

Nos résultats obtenus dans le chapitre III (article 1) suggèrent une activation du métabolisme des hexoses chez *Rhizophagus irregularis* dans le but de synthétiser par exemple du tréhalose et/ou de la chitine qui pourraient permettre au CMA de lutter contre le stress oxydant induit par les HAPs et de limiter l'entrée des HAPs dans le mycélium respectivement. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait possible d'extraire et d'analyser le tréhalose par CLHP en utilisant la méthode développée par Bécard et al. (1991) et de quantifier la chitine par le dosage de la N-acétyl-glucosamine (produit de dégradation de la chitine) grâce à une méthode spectrophotométrique (Reissig et al., 1955; Molano et al., 1977).

De plus, la dégradation des TAG et la formation d'acétyl-coA peut permettre la formation des hexoses *via* le cycle du glyoxylate. Deux gènes *ICL* et *MS*, codant respectivement pour une isocitrate lyase et une malate synthétase ont été étudiés chez *Glomus intraradices* DAOM 197198 (Lammers et al., 2001). La mesure de l'expression de ces deux gènes codant pour deux enzymes clés du cycle du glyoxylate en absence et en présence des HAPs pourrait être envisagée et permettrait de vérifier si la dégradation accrue des TAG en présence du B[a]P conduit à l'activation de ce cycle et à une production plus élevée de glucides.

## II. Impact des HAPs sur le transport du P par le CMA et sa plante hôte

Nos résultats montrent que les HAPs pourraient entraver le bon fonctionnement de la symbiose mycorhizienne en réduisant la quantité de  $^{33}\text{P}$  transféré par *Rhizophagus irregularis* vers les racines. Cependant l'étape exacte affectée par les HAPs lors du transport du P reste incertaine. Est-ce que les HAPs altèrent (i) le prélèvement du P par les hyphes extra-racinaires à partir du milieu et/ou (ii) la translocation du P des hyphes extra-racinaires vers les hyphes intra-racinaires et/ou encore (iii) le transfert du P des hyphes intra-racinaires vers la racine?

Notre étude (article 2) avance un certain nombre d'hypothèses mais pour répondre plus précisément aux questions posées, ce travail doit être complété d'abord par un dosage direct du  $^{33}\text{P}$  dans les hyphes extra-racinaires du compartiment fongique, ensuite par une cinétique de l'expression de deux gènes étudiés (*GiPT* et *GiALP*). En effet, comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, malgré l'absence de changement dans l'expression de ces deux gènes après 6 semaines de culture, nous ne pouvons exclure un changement d'expression de l'un ou des deux gènes pouvant avoir lieu les premières heures ou les premiers jours de croissance du CMA extra-racinaire en contact avec les HAPs.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent une accumulation du P dans les hyphes extra-racinaires du compartiment racinaire, suite à une inhibition de l'activité des phosphatases acides. Cette hypothèse pourrait être vérifiée grâce à une quantification de la concentration des poly-P selon la méthode développée par Ezawa et al. (2004) dans les hyphes extra-racinaires mais également dans les hyphes intra-racinaires (après digestion des racines) (Ezawa et al., 1999).

D'autre part, étant donné que les HAPs peuvent également altérer le transport du P au niveau de la racine hôte, la mesure de l'expression du gène *MtPT4* qui code, chez *Medicago truncatula*, pour un transporteur de type Pht1 localisé au niveau de la membrane périarbusculaire et impliqué dans l'acquisition symbiotique du P (Harrison et al, 2002) pourrait être entreprise. Afin d'isoler et de travailler uniquement sur les cellules contenant les arbuscules, on pourrait faire appel à la technique de microdissection au laser développée par Balestrini et al. (2007).

Il est à noter qu'un changement de matériel biologique végétal sera nécessaire pour entamer ce type d'étude car seul le séquençage du génome de *Medicago truncatula* est disponible à ce jour.

### **III. Rôle du CMA dans la dissipation des HAPs**

L'état des connaissances au début de ce travail de thèse ne permettait pas de dire si le CMA possède une capacité métabolique de dégradation des HAPs. En effet, Verdin et al. (2006) avait montré que la mycorhization arbusculaire des racines de chicorée améliore la dégradation de l'antracène en absence de la microflore rhizosphérique, sans toutefois, ni apporter de preuve directe quant à cette dégradation, ni déterminer le rôle joué par le CMA dans cette dégradation. Est-il impliqué de façon directe (en dégradant lui-même les HAPs?) et/ou indirecte (en améliorant la capacité de dégradation des racines par atténuation de l'effet phytotoxique?).

L'étude réalisée dans le cadre de cette thèse permet de répondre en partie à ces questions mais certaines interrogations subsistent. En effet, le CMA semble capable de dégrader le B[a]P (article 3) mais les mécanismes impliqués dans le prélèvement, le transport, le transfert vers la plante hôte ainsi que dans la dégradation des HAPs par le CMA ne sont pas encore élucidés. Pour compléter cette étude, nous proposons de traiter les aspects suivants:

#### **III.1. Prélèvement et transfert des HAPs par le CMA vers la plante hôte**

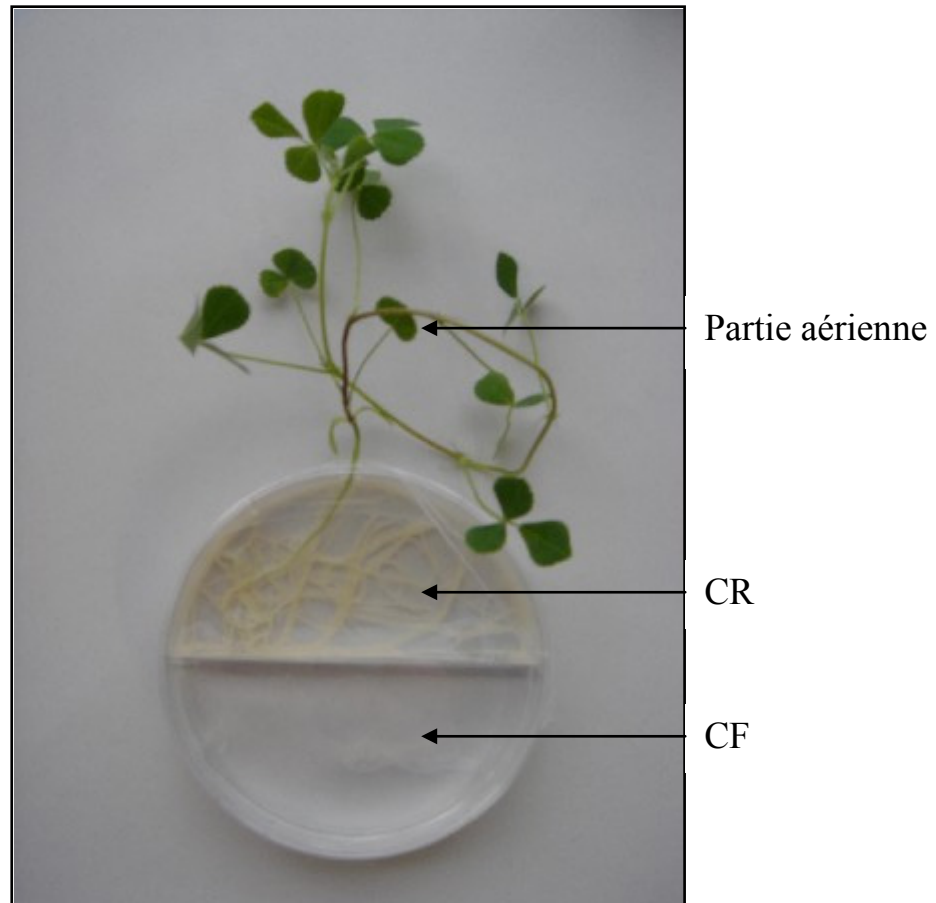
Contrairement aux plantes, peu de données sont disponibles dans la littérature sur les mécanismes de prélèvement des HAPs par les CMA. Récemment, il a été montré que le prélèvement du phénanthrène par les racines de blé se faisait à la fois selon un transport passif et un transport actif de type symport H<sup>+</sup>/phénanthrène (Zhan et al., 2010, 2012). En revanche, les rares études qui se sont intéressées au prélèvement des HAPs par les champignons concernent des champignons saprotrophes et démontrent que l'entrée du B[a]P, par exemple, à l'intérieur des hyphes, avant stockage dans des vésicules lipidiques, se fait grâce à un transport passif (Verdin et al., 2005). Une fois dans les structures fongiques, le flux cytoplasmique permet de véhiculer les globules lipidiques contenant les HAPs sur de plus longues distances (Furuno et al., 2012).

D'autre part, quelques études ont montré que la mycorhization pouvait augmenter l'accumulation des HAPs dans le système racinaire des plantes tout en limitant leur transfert vers la partie aérienne (Cheung et al., 2008; Gao et al., 2010). En effet, Gao et al. ont montré que les CMA étaient capables de prélever et de transporter les HAPs jusqu'au système racinaire des plantes (Gao et al., 2010, 2011). Des observations cytologiques en microscopie à fluorescence ont révélé que les HAPs prélevés sont bioaccumulés dans les globules lipidiques des structures fongiques et racinaires (Verdin et al., 2006; Wu et al., 2009). De plus, Bago et al. (2002a) ont montré qu'il existe un transport bidirectionnel de ces structures dans les hyphes des CMA. Tous ces arguments sont en faveur d'une éventuelle implication de ces globules lipidiques dans le transport des HAPs jusqu'aux racines.

Pour savoir si le prélèvement des HAPs par le CMA se fait selon un processus actif ou passif, nous pourrions, par exemple, utiliser la méthodologie appliquée sur d'autres types de champignons par Verdin et al. (2005a), à savoir l'utilisation d'inhibiteurs du cytosquelette (colchicine et cytochalasine) et de la cytochrome oxydase (azide de sodium).

Par ailleurs, le suivi de l'incorporation des HAPs dans les vésicules lipidiques et leur transport jusqu'aux arbuscules, siège d'échanges entre les deux symbiotes, pourraient être étudiés par microscopie confocale à fluorescence comme décrit, récemment, par Wang et al. (2012).

Enfin, le transfert des HAPs du CMA vers la plante hôte (partie racinaire mais aussi éventuellement partie aérienne) serait important à vérifier en utilisant des HAPs radiomarqués au  $^{14}\text{C}$ . Pour cela, il serait intéressant de faire appel à un dispositif de culture de plante entière *in vitro* (Photo 5), développé par Voets et al. (2009). Ce système expérimental de cultures de plantes entières *in vitro* est en cours de mise en place à l'UCEIV grâce à un stage réalisé dans le laboratoire du Pr S Declerck (MUCL, Louvain la Neuve) suite à l'obtention d'une bourse d'aide à la mobilité doctorale octroyée par la région Nord-Pas de Calais.



**Photo 5:** Plantules de *Medicago truncatula* colonisées par un CMA, qui peut se développer dans le compartiment fongique dans le système de culture *in vitro* en boîte bi-compartimentées. CR = compartiment racinaire, CF = compartiment fongique (d'après Voets et al., 2009).

### III.2. Rôle des globules lipidiques: lieu de stockage ou de dégradation ou simples navettes de transport des HAPs?

A ce jour, le rôle exact de la séquestration des HAPs dans les vésicules lipidiques reste mal compris. Il est probable que l'accumulation des HAPs dans ces structures cellulaires soit liée à une stratégie de protection contre la cytotoxicité de ces polluants et/ou à un stockage transitoire avant leur dégradation (Thion et al., 2012).

D'après la littérature (voir chapitre I., partie 3), ces globules lipidiques sont impliqués dans le stockage d'un pool d'acides gras et de stérols disponibles à tout moment pour la cellule. Ils participent également à la formation et au recyclage des membranes plasmiques (revue de Murphy, 2001). Ces globules contiennent des lipides neutres, essentiellement des TAG et des esters de stérol. Ils sont entourés d'une monocouche membranaire de PL et de

protéines spécifiques (revue de Murphy, 2001) dont les oléosines rencontrées chez les végétaux et qui interviennent dans les mécanismes de fusion (Huang, 1996). Par ailleurs, ces globules lipidiques sont également impliqués dans le métabolisme, la dégradation et la circulation des lipides dans la cellule (revue de Müllner et Daum, 2004). Elles contiennent de nombreuses activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme lipidique telles que la stérol 24-méthyltransférase (biosynthèse des stérols), la TAG lipase (régulation de la quantité de TAG) et la stéryl ester hydrolase (régulation de la quantité de stérols par mise à disposition du substrat aux cytochromes II A1) (revue de Murphy, 2001). D'autre part, ces globules assurent notamment des échanges avec le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique (Sorger et al., 2004). Ils pourraient donc contenir des enzymes qui participeraient à la dégradation des HAPs et/ou à leur transport vers leur lieu de dégradation, le réticulum endoplasmique. En effet, des monooxygénases à cytochrome P450, insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique, seraient impliquées dans la dégradation des HAPs chez certains champignons saprotrophes (Cerniglia, 1993; Verdin et al., 2005).

Pour mieux comprendre leur rôle dans la dissipation des HAPs par le CMA, nous pourrions envisager d'isoler ces vésicules lipidiques (Wentzinger et al., 2002), d'analyser leur contenu lipidique et de doser certaines activités enzymatiques connues pour être impliquées dans la dégradation des HAPs [comme par exemple les monooxygénases à cytochrome P450 (Cerniglia, 1993; Verdin et al., 2005)].

### III.3. Mécanismes impliqués dans la dégradation des HAPs par le CMA: y aurait-il une corrélation entre le stress oxydant et la dégradation des HAPs par le CMA?

Nos résultats présentés dans l'article 3 ont mis en évidence, pour la première fois, la métabolisation du B[a]P par le CMA en dérivés de phtalates. A l'issue de cette étude et en tenant compte des données acquises précédemment concernant le stress oxydant induit par les HAPs chez le CMA (probablement suite à une surproduction d'ERO) ainsi que le rôle protecteur de la mycorhization (Debiane et al., 2008, 2009, 2012), l'hypothèse émise quant aux mécanismes impliqués dans la dégradation des HAPs serait l'intervention du système de production des ERO et de sa régulation, notamment *via* les enzymes anti-oxydantes.

Pour valider cette hypothèse, nous pourrions dans le futur:

- doser directement les ERO dans les organismes symbiotiques, comme par exemple l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en utilisant la méthode de Thordal-Christensen et al. (1997) ou encore en visualisant la production d'ERO grâce à la microscopie à fluorescence suite à l'utilisation d'une sonde fluorescente (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate,  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ) spécifique des ERO (Benabdellah et al., 2009).
- doser les enzymes anti-oxydantes telles que les peroxydases, les laccases et la superoxyde dismutase pourrait également être envisagé (Child et Bardsley, 1975; Mitchell et al., 1994; Superoxide Dismutase Kit, R and D Systems Europe, Abingdon, RU).
- mesurer l'expression des gènes impliqués dans l'élimination des ERO. Aujourd'hui, chez les CMA, le nombre de gènes identifiés codant pour des protéines intervenant dans la suppression des ERO, est limité. Il s'agit de trois gènes codant pour la superoxyde dismutase (González-Guerrero et al., 2005; Lanfranco et al., 2005; González-Guerrero et al., 2010), pour la glutarédoxine (Benabdellah et al., 2009) et pour une méthallothionéine (González-Guerrero et al., 2007). Il serait envisageable d'étudier, par RTq-PCR, l'expression de ces trois gènes *GintGRX1*, *GintSOD1* et *GintMT1* chez le CMA cultivé en présence d'HAPs.

D'autre part, il serait également intéressant d'identifier les enzymes impliquées dans la dégradation des HAPs, comme les monooxygénases à cytochrome P450, intervenant dans la dégradation du B[a]P chez un champignon saprotrophe non ligninolytique, *Fusarium solani* (Verdin et al., 2005a) étant donné l'absence d'informations chez les CMA.

# Références bibliographiques





## A

- ADEME. 2002.** Ecotoxicité des sols et des déchets: résultats des tests biologiques. ADEME édition. (<http://www2.ademe.fr>)
- Adiku S.G.K., Renger M., Wessolek G., Facklam M., Hecht-Bucholtz C. 2001.** Simulation of the dry matter production and seed yield of common beans under varying soil water and salinity conditions. *Agricultural Water Management* **47**: 55-68.
- Akiyama K. 2007.** Chemical identification and functional analysis of apocarotenoids involved in the development of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **71**: 1405-1414.
- Akiyama K., Hayashi H. 2006.** Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Annals of Botany* **97**: 925-931.
- Akiyama K., Matsuzaki K-I., Hayashi H. 2005.** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**: 824-827.
- Alarcón A., Delgado-Martínez J., Franco-Ramírez A., Davies F.T., Ferrera-Cerrato R. 2006.** Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and phytoremediation potential of *Gigaspora margarita* - *Echinochloa polystachya* symbiosis in benzo[a]pyrene-polluted substrate. *Revista Internacional de contaminación Ambiental* **22**: 39-47.
- Albrecht C., Geurts R., Lapeyrie, F., Bisseling T. 1998.** Endomycorrhizae and rhizobial Nod factors both require SYM8 to induce the expression of the early nodulin genes *PsENOD5* and *PsENOD12A*. *Plant Journal* **15**: 605-614.
- Alexander I.J., Ahmad N., See L.S. 1989.** Mycorrhizas in tropical forests. Dans: Proctor J. (ed) Mineral nutrients in tropical forest and savanna ecosystem. Blackwell Scientific Publications, pp. 169-188.
- Al-Garni S.M.S. 2006.** Increased heavy metal tolerance of cowpea plants by dual inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixer Rhizobium bacterium. *African Journal of Biotechnology* **5**: 133-142.
- Alguacil M.M., Hernández J.A., Caravaca F., Portillo B., Roldán A. 2003.** Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil. *Physiologia Plantarum* **118**: 562-570.
- Alvarez F.J., Douglas L.M., Konopka J.B. 2007.** Sterol-rich plasma membrane domains in fungi. *Eukariotic Cell* **6**: 755-763.
- Aono T., Maldonado-Mendoza I.E., Dewbre G.R., Harrison M.J., Saito M. 2004.** Expression of alkaline phosphatase genes in arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* **162**: 525-534.
- Aprill W., Sims R.C. 1990.** Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* **20**: 253-265.
- Apse M.P., Blumwald E. 2002.** Engineering salt tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 146-150.
- Aroca R., Ferrante A., Vernieri P., Chrispeels M.J. 2006.** Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. *Annals of Botany* **98**: 1301-1310.
- Aroca R., Porcel R., Ruiz-Lozano J.M. 2007.** How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist* **173**: 808-816.
- Aroca R., Vernieri P., Ruiz-Lozano J.M. 2008.** Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Lactuca sativa* plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2029-2041.
- Atlas R.M., Bartha R. 1998.** Microbial Ecology. Fundamentals and applications. Addison Wesley Longman, Menlo Park, California, USA, chapitre 8.
- Augé R.M. 2001.** Water relations, drought and vesicular–arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**: 3-42.
- Ayling S.M., Smith S.E., Smith F.A. 2000.** Transmembrane electric potential difference of germ tubes of arbuscular mycorrhizal fungi responds to external stimuli. *New Phytologist* **147**: 631-639.

## B

- Bago B., Vierheilig H., Piché Y., Azcón-Aguilar C. 1996.** Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New phytologist* **133**: 273-280.
- Bago B., Azcón-Aguilar C., Goulet A., Piché Y. 1998a.** Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **139**: 375-388.
- Bago B., Azcón-Aguilar C., Piché Y. 1998b.** Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia* **90**: 52-62.
- Bago B., Pfeffer P.E., Douds D.D., Brouillette J., Bécard G., Shachar-Hill Y. 1999.** Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology* **121**: 263-271.
- Bago B., Pfeffer P.E., Shachar-Hill Y. 2000.** Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* **124**: 949-958.

- Bago B., Zipfel W., Williams R.M., Jun J., Arreola R., Lammers P.J., Pfeiffer P.E., Shachar-Hill Y. 2002a.** Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* **128**: 108-124.
- Bago B., Pfeiffer P.E., Zipfel W., Lammers P., Shachar-Hill Y. 2002b.** Tracking metabolism and imaging in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **244**: 189-197.
- Bago B., Pfeiffer P.E., Abubaker J., Jun J., Allen J.W., Brouillette J., Douds D.D., Lammers P.J., Shachar-Hill Y. 2003.** Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology* **131**: 1496-1507.
- Balestrini R., Lanfranco L. 2006.** Fungal and plant gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **16**: 509-524.
- Balestrini R., Gómez-Ariza J., Lanfranco L., Bonfante P. 2007.** Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 1055-1062.
- Balser T.C., Treseder K.K., Ekenler M. 2005.** Using lipid analysis and hyphal length to quantify AM and saprotrophic fungal abundance along a soil chronosequence. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 601-604.
- Barea J.M., Pozo M.J., Azcón R., Azcón-Aguilar C. 2005.** Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1761-1778.
- Barker S.J., Tagu D., Delp G. 1998.** Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. *Plant Physiology* **116**: 1201-1207.
- BASIAS (<http://basias.brgm.fr>)**
- BASOL (<http://basol.environnement.gouv.fr>)**
- Bates T.R., Lynch J.P. 1996.** Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant, Cell & Environment* **19**: 529-538.
- Bazin M.J., Markham P., Scott E.M., Lynch J.M. 1990.** Population dynamics and rhizosphere interactions. Wiley-Interscience Publication.
- Bécard G., Fortin J.A. 1988.** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on RiT-DNA transformed roots. *New Phytologist* **108**: 211-218.
- Bécard G., Piché Y. 1989.** Fungal growth stimulation by CO<sub>2</sub> and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 2320-2325.
- Bécard G., Pfeiffer P.E. 1993.** Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development. *Protoplasma* **174**: 62-68.
- Bécard G., Doner L.W., Rolin D.B., Douds D.D., Pfeiffer P.E. 1991.** Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by *in vivo* <sup>13</sup>C NMR and HPLC analyses. *New Phytologist* **118**: 547-552.
- Becker D.A., Grenberg R.R., Stone S.F. 1992.** The use of high accuracy NAA for the certification of NIST botanical standard reference materials. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **160**: 41-53.
- Beilby J.P. 1980.** Fatty acid and sterol composition of ungerminated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora laevis*. *Lipids* **15**: 949-952.
- Beilby J.P. 1983.** Effects of inhibitors on early protein, RNA, and lipid synthesis in germinating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores of *Glomus caledonium*. *Canadian Journal of Botany* **29**: 596-601.
- Beilby J.P., Kidby D.K. 1980a.** Biochemistry of ungerminated and germinated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus caledonium*: changes in neutral and polar lipids. *Journal of Lipid Research* **21**: 739-750.
- Beilby J.P., Kidby D.K. 1980b.** Sterol composition of ungerminated and germinated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus caledonium*. *Lipids* **15**: 375-378.
- Benabdellah K., Merlos M.-A., Azcón-Aguilar C., Ferrol N. 2009.** *GintGRX1*, the first characterized glomeromycotan glutaredoxin, is a multifunctional enzyme that responds to oxidative stress. *Fungal Genetics and Biology* **46**: 94-103.
- Benedetto A., Magurno F., Bonfante P., Lanfranco L. 2005.** Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **15**: 620-627.
- Bentivenga S.P., Morton J.B. 1994.** Stability and heritability of fatty acid methyl ester profiles of Glomalean endomycorrhizal fungi. *Mycological Research* **98**: 1419-1426.
- Bentivenga S.P., Morton J.B. 1996.** Congruence of fatty acid methyl ester profiles and morphological characters of arbuscular mycorrhizal fungi in Gigasporaceae. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.* **93**: 5659-5662.
- Berreck M., Haselwandter K. 2001.** Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis upon uptake of cesium and other cations by plants. *Mycorrhiza* **10**: 275-280.
- Bert V., Lounès-Hadj Sahraoui A., Leyval C., Fontaine J., Ouvrard S. 2012.** *Les phytotechnologies appliqués aux sites et sols pollués*. ADEME/INERIS. EdpSciences.
- Besserer A., Puech-Pagès V., Kiefer P., Gomez-Roldan V., Jauneau A., Roy S., Portais J.-C., Roux C., Bécard G., Séjalon-Delmas N. 2006.** Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology* **4**: e226.
- Bevedge D.I., Bowen G.D., Skinnner M.F. 1975.** Comparative carbohydrate physiology of ecto- and endomycorrhizas. Dans: Sanders F.E., Mosse B. et Tinker P.B. (eds) *Endomycorrhizas*. Academic Press, pp. 149-174.

- Bewley R., Ellis B., Theile P., Viney I., Rees J. 1989. Microbial cleanup of contaminated soil. *Chemistry and Industry* **23**: 778-783.
- Bhat R.A., Panstruga R. 2005. Lipid rafts in plants. *Planta* **223**: 5-19.
- Biache C., Mansuy-Huault L., Faure P., Munier-Lamy C., Leyval C. 2008. Effects of thermal desorption on the composition of two coking plant soils: impact on solvent extractable organic compounds and metal bioavailability. *Environmental Pollution* **156**: 671-677.
- Bianciotto V., Barbiero G., Bonfante P. 1995. Analysis of the cell cycle in an arbuscular mycorrhizal fungus by flow cytometry and bromodeoxyuridine labelling. *Protoplasma* **188**: 161-169.
- Biermann B., Linderman R.G. 1983. Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist* **95**: 97-105.
- Binet P., Portal J-M., Leyval C. 2000a. Dissipation of 3-6 ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 2011-2017.
- Binet P., Portal J-M., Leyval C. 2000b. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant and Soil* **227**: 207-213.
- Binet P., Portal J-M., Leyval C. 2001. Application of GC-MS to the study of anthracene disappearance in the rhizosphere of ryegrass. *Organic Geochemistry* **32**: 217-222.
- Bispo A., Jourdain M.J., Jauzein M. 1999. Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Organic Geochemistry* **30**: 947-952.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**: 179-194.
- Blumer M. 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. *Scientific America* **234**: 35-45.
- Boar R.B., Allen J. 1973. *Phytochemistry* **12**: 2571.
- Bogan B.W., Lamar R.T., Burgos W.D., Tien M. 1999. Extent of humification of anthracene, fluoranthene, and benzo[a]pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils. *Letters in Applied Microbiology* **28**: 250-254.
- Bogdanov M., Umeda M., Dowhan W. 1999. Phospholipid assisted refolding of an integral membrane protein. Minimum structural features for phosphatidylethanolamine to act as a molecular chaperone. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 12339-12345.
- Bolandnazar S., Aliasgarzad N., Neishabury M.R., Chaparzadeh N. 2007. Mycorrhizal colonization improves onion (*Allium cepa* L.) yield and water use efficiency under water deficit condition. *Scientia Horticulturae* **114**: 11-15.
- Bonfante-Fasolo P. 1984. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. Dans: Conway L.I., Powell D., Bagyaraj D.J. (eds) *VA mycorrhiza*. Boca Raton, USA, CRC Press.
- Bonfante P., Bianciotto V. 1995. Saprotrophic versus symbiotic phase in endomycorrhizal fungi: morphology and cytology. In: Hodi B., Varma A. (eds) *Mycorrhizas: Molecular Biology and Biotechnology*. Springer-Verlag, Allemagne, pp. 229-247.
- Bonfante P., Perotto S. 1995. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* **130**: 3-21.
- Bonfante P., Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* **1**: 48.
- Bonfante P., Requena N. 2011. Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 451-457.
- Bonfante P., Balestrini R., Genre A., Lanfranco L. 2009. Establishment and functioning of arbuscular mycorrhizas. Dans: Deising H.B. (ed) *The Mycota, V. Plant relationships* 2nd edition. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 259-274.
- Bossert I., Bartha R. 1985. Plant growth in soils with a history of oily sludge disposal. *Soil Science* **140**: 75-77.
- Boudsoq M., Lauriere C. 2005. Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiology* **138**: 1185-1194.
- Branco M.R., Marinho H.S., Cyrne L., Antunes F. 2004. Decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plasma membrane permeability during adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 6501-6506.
- Brechenmacher L., Weidmann S., Van Tuinen D., Chatagnier O., Gianinazzo S., Franken P., Gianinazzi-Pearson V. 2004. Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stages of *Medicago truncatula*-*Glomus mosseae* interactions. *Mycorrhiza* **14**: 253-262.
- Breullin F., Schramm J., Hajirezaei M., Ahkami A., Favre P., Druege U., Hause B., Bucher M., Kretschmar T., Bossolini E., Kuhlmeier C., Martinoia E., Franken P., Scholz U., Reinhardt D. 2010. Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and repress genes involved in mycorrhizal functioning. *The Plant Journal* **64**: 1002-1017.
- Breuninger M., Trujillo C.G., Serrano E., Fischer R., Requena N. 2004. Different nitrogen sources modulate activity but not expression of glutamine synthetase in arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 542-552.
- Bromilow R.H., Evans A.A., Nicholls P.H. 1999. Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soils types: 1. Laboratory incubations. *Pest Science* **55**: 1129-1134.

- Brooks R.R. 1997.** Plant hyperaccumulators of metals and their role in mineral exploration, archaeology, and land remediation. Dans: Remediation of soils contaminated with metals. Proceedings of a conference on the biochemistry of Trace elements, Taiwan, pp. 123-133.
- Brundrett M.C. 2002.** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* **154**: 275-304.
- Brundrett M.C. 2004.** Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* **79**: 473-495.
- Brundrett M.C. 2009.** Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* **320**: 37-77.
- Brundrett M.C., Kendrick B. 1988.** The mycorrhizal status, root anatomy and phenology of plants in a sugar maple forest. *Canadian Journal of Botany* **66**: 1153-1173.
- Brundrett M.C., Kendrick B. 1990.** The roots and mycorrhizas of herbaceous woodland plants. II. Structural aspects of morphology. *New Phytologist* **114**: 469-479.
- Brundrett M., Kendrick B., Peterson L. 1991.** Efficient lipid staining in plant material with sudan red 7B or fluorol yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnology and Histochemistry* **66**: 111-116.
- Bucher M. 2010.** A novel lipid signal in the arbuscular mycorrhizal symbiosis within eyesight? *New Phytologist* **185**: 593-595.
- Bucher M., Wegmüller S., Drissner D. 2009.** Chasing the structures of small molecules in arbuscular mycorrhizal signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 500-507.
- Bücking H., Shachar-Hill Y. 2005.** Phosphate uptake, transport and transfer by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is stimulated by increased carbohydrate availability. *New Phytologist* **165**: 899-912.
- Buée M., Rossignol M., Jauneau A., Ranjeva R., Bécard G. 2000.** The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 693-698.
- Bumpus J.A. 1989.** Biodegradation of polycyclic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 154-158.
- Burgess T, Dell B, Malajczuk N. 1994.** Variations in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *New Phytologist* **127**: 731-739.
- Burke S., Angle J., Chaney R., Cunningham S. 2000.** Arbuscular mycorrhizae effects on heavy metal uptake by corn. *International Journal of Phytoremediation* **2**: 23-29.
- Burken J.G., Shanks J.V., Thompson P.L. 2000.** Phytoremediation and plant metabolism of explosives and nitroaromatic compounds. Dans: Spain J.C., Hugues J.B., Knackmuss H.J. (eds). Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. Lewis, Washington.

## C

- Cajthaml T., Bhatt M., Šašek V., Matějů V. 2002a.** Bioremediation of PAH-contaminated soil by composting: a case study. *Folia Microbiologica* **47**: 696-700.
- Cajthaml T., Möder M., Kačer P., Šašek V., Popp P. 2002b.** Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* **974**: 213-222.
- Calonne M., Fontaine J., Debiane D., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A. 2010.** Propiconazole toxicity on the non-target organism, the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus irregulare*. Dans: Carisse O, ed. *Fungicides*. InTech, Rijeka, pp. 325-346.
- Calonne M., Lounès-Hadj Sahraoui A., Campagnac E., Debiane D., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Fontaine J. 2012.** Propiconazole inhibits the sterol 14 $\alpha$ -demethylase in *Glomus irregulare* like in phytopathogenic fungi. *Chemosphere* **87**: 376-383.
- Campagnac E., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A., Laruelle F., Durand R., Grandmougin-Ferjani A. 2008.** Differential effects of fenpropimorph and fenhexamid, two sterol biosynthesis inhibitor fungicides, on arbuscular mycorrhizal development and sterol metabolism in carrot roots. *Phytochemistry* **69**: 2912-2919.
- Campagnac E., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A., Laruelle F., Durand R., Grandmougin-Ferjani A. 2009.** Fenpropimorph slows down the sterol pathway and the development of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* **19**: 365-374.
- Campagnac E., Lounès-Hadj Sahraoui A., Debiane D., Fontaine J., Laruelle F., Garçon G., Verdin A., Durand R., Shirali P., Grandmougin-Ferjani A. 2010.** Arbuscular mycorrhiza partially protect chicory roots against oxidative stress induced by two fungicides, fenpropimorph and fenhexamid. *Mycorrhiza* **20**: 167-178.
- Campos A.N.d.R., Costa M.D., Tótola M.R., Borges A.C. 2008.** Total lipid and fatty acid accumulation during basidiospore formation in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithius* sp. *Revista brasiliense de Ciências do Solo* **32**: 1531-1540.
- Cantrell I.C., Linderman R.G. 2001.** Preinoculation of lettuce and onion with VA mycorrhizal fungi reduces deleterious effects of soil salinity. *Plant and Soil* **233**: 269-281.

- Capoen W., Sun J., Wysham D., Otegui M.S., Venkateshwaran M., Hirsch S., Miwa H., Downie J.A., Morris R.J., Ané J.M., Oldroyd G.E. 2011. Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* **108**: 14348-14353.
- Cavagnaro TR, Gao L-L, Smith FA, Smith SE. 2001. Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity. *New Phytologist* **151**: 469-475.
- Cébron A., Norini M-P., Beguiristain T., Leyval C. 2008. Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods* **73**: 148-159.
- Centre Interprofessionnel Technique d'Etude de la Pollution Atmosphérique (CITEPA). 2007. <http://www.citepa.org/emissions/index.htm>.
- Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA). (<http://www.citepa.org/fr/pollution-et-climat/polluants/polluant-organiques-persistants/hydrocarbures-aromatiques-polycycliques>)
- Cerniglia C.E. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* **4**: 331-338.
- Cerniglia C.E. 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **19**: 324-333.
- Cerniglia C.E., Gibson D.T. 1979. Oxidation of ben[a]pyrene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *The Journal of Biological Chemistry* **254**: 12174-12180.
- Cerniglia C.E., Sutherland J.B. 2006. Relative roles of bacteria and fungi in polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and bioremediation of contaminated soils. Dans: Gadd G.M. (ed) *Fungi in Biochemical Cycles*. Cambridge University Press, UK, chapitre 8, pp. 182-211
- Cerniglia C.E., Gibson D.T., Dodge R.H. 1994. Metabolism of benzo[a]anthracene by filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 3931-3938.
- Chabaud M., Venard C., Defaux-Petras A., Bécard G., Barker D.G. 2002. Targeted inoculation of *Medicago truncatula* in vitro root cultures reveals MtENOD11 expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **156**: 265-273.
- Chabaud M., Genre A., Sieberer B.J., Faccio A., Fournier J., Novero M., Barker D.G., Bonfante P. 2011. Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger CA<sup>2+</sup> spiking in the legume and nonlegume root epidermis. *New Phytologist* **189**: 347-355.
- Chabot S., Bécard G., Piché Y. 1992. Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia* **84**: 315-321.
- Chaîneau C.H., Morel J-L., Oudot J. 1997. Phytotoxicity and plant uptakes of fuel oil hydrocarbons. *Journal of Environmental Quality* **26**: 1478-1483.
- Chandanie W.A., Kubota M., Hyakumachi M. 2006. Interactions between plant growth promoting fungi and arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and induction of systemic resistance to anthracnose disease in cucumber. *Plant and Soil* **286**: 209-217.
- Chefetz B., Deshmukh A.P., Hatcher P.G. 2000. Pyrene sorption by natural organic matter. *Environmental Science and Technology* **34**: 2925-2930.
- Chen B., Shen H., Li X., Feng G., Christie P. 2004. Effects of EDTA application and arbuscular mycorrhizal colonization on growth and zinc uptake by maize (*Zea mays* L.) in soil experimentally contaminated with zinc. *Plant and Soil* **261**: 219-229.
- Chen B.D., Aitken G.R. 1999. Salicylate stimulate the degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environmental Science and Technology* **33**: 435-439.
- Chen B.D., Zhu Y-G., Duan J., Smith S.E. 2007. Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and metal uptake by four plant species in copper mine tailings. *Environmental Pollution* **147**: 374-380.
- Chen Y-C., Banks M.K., Schwab A.P. 2003. Pyrene degradation in the rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*) and switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Environmental Science and Technology* **37**: 5778-5782.
- Cheung K.C., Zhang J.Y., Deng H.H., Ou Y.K., Leung H.M., Wu S.C., Wong M.H. 2008. Interaction of higher plant jute, electrofused bacteria and mycorrhiza on anthracene biodegradation. *Bioresource Technology* **99**: 2148-2155.
- Chiapusio G., Pujol S., Toussaint M.L., Badot P.M., Binet P. 2007. Phenanthrene toxicity and dissipation in rhizosphere of grassland plants (*Lolium perenne* L. and *Trifolium pratense* L.) in three spiked soils. *Plant and Soil* **294**: 103-112.
- Childs R.E., Bardsley W.G. 1975. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochemical Journal* **145**: 93-103.
- Chiocchio V., Venedikian N., Martinez A.E., Menendez A., Ocampo J.A., Godeas A. 2000. Effect of the fungicide benomyl on spore germination and hyphal length of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *International Microbiology* **3**: 173-175.
- Chiou C.T., Sheng G., Manes M., 2001. A partition-limited model for the plant uptake of organic contaminants from soil and water. *Environmental Science and Technology* **35**: 1437-1444.
- Cooper K.M., Lösel D.M. 1978. Lipid physiology of vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. Composition of lipids in roots of onion, clover and ryegrass infected with *Glomus mosseae*. *New Phytologist* **80**: 143-151.
- Cooper K.M., Tinker P.B., 1978. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. II. Uptake and translocation of phosphorus, zinc and sulphur. *New Phytologist* **81**: 43-52.



- Coppey L. 2011.** Impact des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur le cycle de développement d'un champignon mycorrhizien à arbuscules *Glomus irregulare*. Rapport de stages de Master 1 Environnement Naturel et Anthropisé. Stage réalisé au sein de l'Unité de Chimie Environnementale et Interaction sur le Vivant, Université du Littoral Côte d'Opale.
- Cordier C., Pozo M.J., Barea J.M., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. 1998.** Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 1017-1028.
- Corgié S.C., Fons F., Beguiristain T., Leyval C. 2006.** Biodegradation of phenanthrene, spatial distribution of bacterial populations and dioxygenase expression in the mycorrhizosphere of *Lolium perenne* inoculated with *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **16**: 207-212.
- Corgié S.C., Joner E.J., Leyval C. 2003.** Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. *Plant and Soil* **257**: 143-150.
- Costes J.M., Druelle V. 1997.** Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement: la réhabilitation des anciens sites industriels. *Oil & Gas Science and Technology* **52**: 425-440.
- Cowan A.K. 2006.** Phospholipids as plant growth regulators. *Plant Growth Regulation* **48**: 97-109.
- Cox G., Sanders F.E., Tinker P.B., Wild J.A. 1975.** Ultrastructural evidence relating to host-endophyte transfer in vesicular-arbuscular mycorrhiza. Dans: Sanders F.E., Mosse B., Tinker P.B. (eds) *Endomycorrhizas*. Academic Press, London, pp 297-312.
- Crépineau C., Rychen G., Feidt C., Le Roux Y., Lichtfouse E., Laurent F. 2003.** Contamination of pastures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the vicinity of a highway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 4841-4845.
- Cronquist A. 1968.** *The evolution and classification of flowering plants*.
- Cruz C., Egsgaard H., Trujillo C., Ambus P., Requena N., Martins-Loução M.A., Jakobsen I. 2007.** Enzymatic evidence for the keyrole of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* **144**: 782-792.
- Cui M., Caldwell M.M. 1996.** Facilitation of plant phosphate acquisition by arbuscular mycorrhizas from enriched soil patches. II. Hyphae exploiting root-free soil. *New Phytologist* **133**: 461-467.

## D

- Dalpe Y. 1995.** Systématique des endomycorhizes à vésicules et arbuscules : de la mycopaléontologie à la biochimie. Dans: Fortin J.A., Charest C. et Piché Y (eds). La symbiose Mycorrhizienne, état des connaissances. Orbis Publishing, pp 1-20.
- Dalpe Y. 2005.** Mycorrhizae: a potential tool for plant protection but not a panacea. *Phytoprotection* **86**: 53-59.
- Dalpe Y., De Souza F.A., Declerck S. 2005.** Life cycle of *Glomus* species in monoxenic culture. Dans : Declerck S., Strullu D.G., Fortin J.A. (eds). *In vitro* culture of mycorrhizas. Springer-Verlag, Germany, pp.49-71.
- Dalpe Y., Trépanier M., Lounès-Hadj Sahraoui A., Fontaine J., Sancholle M.** Lipid of Mycorrhiza. Dans: Hock B. (ed) The Mycota IX. Springer-Verlag, Allemagne, Chapitre 8 (sous presse).
- Davies F.T., Puryear J.D., Newton R.J., Egilla J.N., Saraiva Grossi J.A. 2001.** Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Plant Physiology* **158**: 777-786.
- Davis L.C., Banks M.L., Schwab A.P., Muralidharan N., Erickson L.E., Tracy J.C. 1996.** Plant based bioremediation. Dans: Si (Ed). Bioremediation.
- De La Noval B., Perez E., Martinez B., Leon O., Martinez-Gallardo N., Delano-Frier J. 2007.** Exogenous systemin has a contrasting effect on disease resistance in mycorrhizal tomato (*Solanum lycopersicum*) plants infected with necrotrophic or hemibiotrophic pathogens. *Mycorrhiza* **17**: 449-460.
- Debiane D., Garçon G., Verdin A., Fontaine J., Durand R., Grandmougin-Ferjani A., Shirali P., Lounès-Hadj Sahraoui A., 2008.** *In vitro* evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environmental and Experimental Botany* **64**: 120-127.
- Debiane D., Garçon G., Verdin A., Fontaine J., Durand R., Shirali P., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A. 2009.** Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. *Phytochemistry* **70**: 1421-1427.
- Debiane D., Calonne M., Fontaine J., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A. 2011.** Lipid content disturbance in the arbuscular mycorrhizal, *Glomus irregulare* grown in monoxenic conditions under PAHs pollution. *Fungal Biology* **115**: 782-792.
- Debiane D., Calonne M., Fontaine J., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A. 2012.** Benzo[a]pyrene induced lipid changes in the monoxenic arbuscular mycorrhizal chicory roots. *Journal of Hazardous Materials* **209-210**: 18-26.
- Declerck S., Strullu D.G., Plenchette C. 1998.** Monoxenic culture of the intraradical forms of the *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia* **90**: 579-585.
- Declerck S., Cranenbrouck S., Dalpe Y., Séguin S., Grandmougin-Ferjani A., Fontaine J., Sancholle M. 2000.** *Glomus proliferum* sp. nov.: a description based on morphological, biochemical, molecular and monoxenic cultivation data. *Mycologia* **92**: 1178-1187.

- Declerck S., Dupré de Boulois H., Bivort C., Delvaux B. 2003.** Extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus lamellosum* can take up, accumulate and translocate radiocaesium under root-organ culture conditions. *Environmental Microbiology* **5**: 510-516.
- Del Val C., Barea J.M., Azcón-Aguilar C. 1999.** Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 718-723.
- Dell B., Malajczuk N., Bougher N.L., Thompson G. 1994.** Development and function of *Pisolithus* and *Scleroderma* ectomycorrhizas formed *in vivo* with *Allocasuarina*, *Casuarina* and *Eucalyptus*. *Mycorrhiza* **5**: 129-138.
- Delory G.E., King E.J. 1945.** A sodium carbonate-bicarbonate buffer for alkaline phosphatases. *Biochemistry* **39**: 16.
- Dennis J.M., Massey R.C., McWenny D.J., Watson D.H. 1983.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK diet. Dans: Polycyclic aromatic hydrocarbons: formation, metabolism and measurement. Proceedings of the 7th Polynuclear Aromatic Hydrocarbon International Symposium. Battelle Press, pp. 405.
- Derewenda Z.S. 1994.** Structure and function of lipases. Dans: Schumaker V.N. (ed) *Advances in protein chemistry, Vol. 45. Lipoproteins, apolipoproteins and lipases*. Academic Press, USA, pp. 1-52.
- Dexheimer J., Gérard J. 1993.** Application de quelques techniques cytochimiques à l'étude des interfaces des ectendomycorhizes de Monotrope (*Monotropa hypopitys* L.). *Acta Botanica Gallica* **140**: 459-472.
- Díaz G., Azcón-Aguilar C., Honrubia M. 1996.** Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant and Soil* **180**: 241-249.
- Dickson S. 2005.** The *Arum-Paris* continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* **163**: 187-200.
- Dickson S., Smith F.A., Smith S.E. 2007.** Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next? *Mycorrhiza* **17**: 375-393.
- Disch A., Rohmer M. 1998.** On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. *FEMS Microbiology Letters* **168**: 201-208.
- Dittmer J. C., Lester R.L. 1964.** A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *Journal of Lipid Research* **5**: 126-127.
- Dodd J.C., Jeffries P. 1989.** Effect of fungicides on three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biology and Fertility of Soils* **7**: 120-128.
- Doidy J., Grace E., Kühn C., Simon-Plas F., Casieri L., Wipf D. 2012.** Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in Plant Science* **17**: 413-422.
- Doner L.W., Bécard G. 1991.** Solubilization of gellan gels by chelation of cations. *Biotechnology Techniques* **5**: 25-28.
- Drissner D., Kunze G., Callewaert N., Gehrig P., Tamasloukht M., Boller T., Felix G., Amrhein N., Bucher M. 2007.** Lyso-phosphatidylcholine is a signal in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Science* **18**: 265-268.
- Dumas-Gaudot E., Gollotte A., Cordier C., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. 2000.** Modulation of host defence systems. Dans: Kapulnik Y., Doude D.D. (eds) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publishers, pp. 173-200.
- Dupré de Boulois H., Delvaux B., Declerck S. 2005.** Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the root uptake and translocation of radiocaesium. *Environmental Pollution* **134**: 515-524.
- Dupré de Boulois H., Voets L., Delvaux B., Jakobsen I., Declerck S. 2006.** Transport of radiocaesium by arbuscular mycorrhizal fungi to *Medicago truncatula* under *in vitro* conditions. *Environmental Microbiology* **8**: 1926-1934.

## E

- Edidin M. 2003.** The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Biophysics* **32**: 257-283.
- Ellis B., Harold P., Kronberg H. 1991.** Bioremediation of a creosote contaminated site. *Environmental Technology* **12**: 447-459.
- Endre G., Kereszt A., Kevei Z., Mihacea S., Kaló P., Kiss G.B. 2002.** A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**: 962-966.
- Environmental Protection Agency (US-EPA). (1992).** Environmental Regulations and Technology: Vector Attraction in Sewage Sludge. EPA/625/R-92/013. Washington, D.C.
- Environmental Protection Agency (US-EPA). 2007.** Electronic Code of Federal Regulations (e-CFR) Title 40: Protection of Environment, appendix A to PART 423-261-Priority pollutants.
- Eom I.C., Rast C., Veber A.M., Vasseur P. 2007.** Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **67**: 190-205.
- Erickson D.C., Loehr R.C., Neuhauser E.F. 1993.** PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils. *Water Research* **27**: 911-919.
- Evelin H., Kapoor R., Giri B. 2009.** Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany* **104**: 1263-1280.



- Exton J.H. 1990.** Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 1-4.
- Exton J.H. 1994.** Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochimical and Biophysica Acta* **1212**: 26-42.
- Ezawa T., Saito M., Yoshida T. 1995.** Comparison of phosphatase localization in the intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus* spp. and *Gigaspora* spp. *Plant and Soil* **176**: 57-63.
- Ezawa T., Kuwahara S., Sakamoto K., Yoshida T., Saito M. 1999.** Specific inhibitor and substrate specificity of alkaline phosphatase expressed in the symbiotic phase of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus etunicatum*. *Mycologia* **91**: 636-641.
- Ezawa T., Smith S.E., Smith F.A. 2001.** Differentiation of polyphosphate metabolism between the extra- and intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **149**: 555-563.
- Ezawa T., Cagnano T.R., Smith S.E., Smith F.A., Ohtomo R. 2004.** Rapid accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase/luciferase system. *New Phytologist* **161**: 387-392.

## F

- Feix I., Wiart J. 1995.** Les micropolluants organiques dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines. ADEME.
- Feng G., Song Y.C., Li X.L., Christie P. 2003.** Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to utilization of organic sources of phosphorus by red clover in a calcareous soil. *Applied Soil Ecology* **22**: 139-148.
- Feng G., Zhang X., Li X., Tian C., Tang C., Rengel Z. 2002.** Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza* **12**: 185-190.
- Ferrol N., Pozo M.J., Antelo M., Azcon-Aguilar C. 2002.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1683-1687.
- Ferrol N., González-Guerrero M., Valderas A., Benabdellah K., Azcón-Aguilar C. 2009.** Survival strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Phytochemistry Reviews* **8**: 551-559.
- Fester T., Strack D., Hause B. 2001.** Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta* **213**: 864-868.
- Field J.A., De Jong E., Feijoo-Costa G.F., De Bont J.A.M. 1992.** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 2219-2226.
- Fismes J., Perrin-Ganier C., Empereur-Bissonnet P., Morel J.L. 2002.** Soil-to-root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils. *Journal of Environmental Quality* **31**: 1649-1656.
- Fitter A.H. 2005.** Darkness visible: reflections on underground ecology. *Journal of Ecology* **93**: 231-243.
- Fitter A.H. 2006.** What is the link between carbon and phosphorus fluxes in arbuscular mycorrhizas? A null hypothesis for symbiotic function. *New Phytologist* **172**: 3-6.
- Fontaine J. 2001.** Etude du métabolisme lipidique d'un champignon endomycorhizien à vésicules et arbuscules: *Glomus intraradices*. Thèse de doctorat en physiologie végétale de l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), Calais.
- Fontaine J., Grandmougin-Ferjani A., Sancholle M. 2001a.** Métabolisme lipidique du champignon endomycorhizien *Glomus intraradices*. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* **324**: 847-853.
- Fontaine J., Grandmougin-Ferjani A., Hartmann M-A., Sancholle M. 2001b.** Sterol biosynthesis by arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Lipids* **36**: 1357-1363.
- Fontaine J., Grandmougin-Ferjani A., Glorian V., Durand R. 2004.** 24 Methyl/methylene sterols increase in monoxenic roots after colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **163**: 159-167.
- Fortin J.A., Bécard G., Declerck S., Dalpé Y., St Arnaud M., Coughlan A.P., Piché Y. 2002.** Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Canadian Journal of Botany* **80**: 1-20.
- Franck B. 1885.** Über die auf Wurzelymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **3**: 128-145.
- Franco-Ramírez A., Ferrera-Cerrato R., Varela-Fregoso L., Pérez-Moreno J., Alarcón A. 2007.** Arbuscular mycorrhizal fungi in chronically petroleum-contaminated soils in Mexico and the effects of petroleum hydrocarbons on spore germination. *Journal of Basic Microbiology* **47**: 378-383.
- Fraústro Da Silva J.J.R., Williams R.J.P. 2001.** The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life, 2<sup>nd</sup> Edition. Oxford: Clarendon Press.
- Frey B., Buser H.R., Schüepp H. 1992.** Identification of ergosterol in vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Biology and Fertility of Soils* **13**: 229-234.
- Frey B., Vilariño A., Schüepp H., Arines J. 1994.** Chitin and ergosterol content of extraradical and intraradical mycelium of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Soil Biology and Biochemistry* **26**: 711-717.
- Frick C.M., Farrell R.E., Germida J.J. 1999.** Assessment of phytoremediation as an *in-situ* technique for cleaning oil-contaminated sites PTAC Petroleum Technology Alliance Canada, Calgary.

- Fritz M., Jakobsen I., Lyngkjaer M.F., Thordal-Christensen H., Pons-Kühnemann J. 2006.** Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza* **16**: 413-419.
- Frostegård Å, Tunlid A., Bååth E. 1993.** Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 3605-3617.
- Fujiyoshi M., Nakatsubo T., Ogura S., Horikoshi T. 2000.** Estimation of mycelial biomass of arbuscular mycorrhizal fungi associated with the annual legume *Kummerowia striata* by ergosterol analysis. *Ecological Research* **15**: 121-131.
- Furuno S, Foss S, Wild E, Jones KC, Semple KT, Harms H, Wick LY. 2012.** Mycelia promote active transport and spatial dispersion of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* **46**: 5463-5470.

## G

- Gallou A., Mosquera H.P.L., Cranenbrouck S., Suárez J.P., Declerck S. 2011.** Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **76**: 20-26.
- Gao Y., Zhu L. 2004.** Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere* **55**: 1169-1178.
- Gao Y.Z., Ling W.T., Wong M.H. 2006.** Plant-accelerated dissipation of phenanthrene and pyrene from water in the presence of a non-ionic surfactant. *Chemosphere* **63**: 1560-1567.
- Gao Y., Cheng Z., Ling W., Huang J. 2010.** Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae contribute to the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant roots. *Bioresource Technology* **101**: 6895-6901.
- Gao Y., Li Q., Ling W., Zhu X. 2011.** Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soils contaminated with phenanthrene and pyrene. *Journal of Hazardous Materials* **185**: 703-709.
- Gaspar M.L., Pollero R.J., Cabello M.N. 1994a.** Triacylglycerol consumption during spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of American Oil Chemistry Society* **71**: 449-452.
- Gaspar M.L., Pollero R.J., Cabello M.N. 1994b.** *Glomus antarcticum*: the lipids and fatty acid composition. *Mycotaxon* **60**: 129-136
- Gaspar M.L., Pollero R.J., Cabello M.N. 1997.** Variations in the lipid composition of alfalfa roots during colonization with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Mycologia* **89**: 37-42.
- Gaspar M.L., Pollero R.J., Cabello M.N. 2001.** Biosynthesis and degradation of glycerides in external mycelium of *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **11**: 257-261.
- Gaspar M.L., Cabello M.N., Cazau M.C., Pollero R.J. 2002.** Effect of phenanthrene and *Rhodotorula glutinis* on arbuscular mycorrhizal fungus colonization of maize roots. *Mycorrhiza* **12**: 55-59.
- Gaude N., Nakamura Y., Scheible W.R., Ohta H., Dormann P. 2008.** Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of Arabidopsis. *The Plant Journal* **56**: 28-39.
- Gavito M.E., Olsson P.A., Rouhier H., Medina-Peñañiel A., Jakobsen I., Bago A., Azcón-Aguilar C. 2005.** Temperature constraints on the growth and functioning of root organ cultures with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **168**: 179-188.
- Gebauer G., Meyer M. 2003.** <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* **160**: 209-223.
- Gellerman J.L., Schlenck H. 1963.** A group of fatty acids with 'tetramethylene interruption' in the double bond system. *Cellular and Molecular Life Sciences* **19**: 522-523.
- Genre A. 2012.** Signaling and the re-structuring of plant cell architecture in AM symbiosis. Dans: Perotto S., Baluska F. (eds) *Signaling and communications in plant symbiosis*, volume 10. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Genre A., Chabaud M., Timmers T., Bonfante P., Barker D.G. 2005.** Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* **17**: 3489-3499.
- Genre A., Chabaud M., Faccio A., Barker D.G., Bonfante P. 2008.** Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* **20**: 1407-1420.
- Genre A., Ortu G., Bertholdo C., Martino E., Bonfante P. 2009.** Biotic and abiotic stimulation of root epidermal cells reveals common and specific responses to arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* **149**: 1424-1434.
- Gerdemann J.W. 1968.** Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annual Review of Phytopathology* **6**: 397-418.
- Gerhardt K.E., Huang X-D., Glick B.R., Greenberg B.M. 2009.** Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Science* **176**: 20-30.
- Gianinazzi-Pearson V, Smith SE, Gianinazzi S, Smith FA. 1991.** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. V. Is H<sup>+</sup>-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces? *New Phytologist* **117**: 61-74
- Gildon A., Tinker P.B. 1983.** Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. I. The

effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* **95**: 247-261.

**Giovannetti M., Avio L., Sbrana C. 2010.** Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth: physiological and genetic aspects. Dans: Koltai H., Kapulnik Y (eds) *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and Function, 2nd Edition*. Springer Science + Business Media.

**Giri B., Kapoor R., Mukerji K.G. 2007.** Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* may be partly related to elevated K/Na ratios in root and shoot tissues. *Microbial Ecology* **54**: 753-760.

**Gomez S.K., Javot H., Deewatthanawong P., Torres-Jerez I., Tang Y., Balcaflor E.B., Udvardi M.K., Harrison M.J. 2009.** *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BioMed Central Plant Biology* **9**: 10. 19p.

**González-Chávez M.C., Carrillo-González R., Wright S.F., Nichols K.A. 2004.** The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution* **130**: 317-323.

**González-Guerrero M., Azcón-Aguilar C., Mooney M., Valderas A., MacDiarmid C.W., Ferrol N. 2005.** Characterization of a *Glomus intraradices* gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 130-140.

**González-Guerrero M., Cano C., Azcón-Aguilar C., Ferrol N. 2007.** *GintMT1* encodes a functional metallothionein in *Glomus intraradices* that responds to oxidative stress. *Mycorrhiza* **17**: 327-335.

**González-Guerrero M., Melville L.H., Ferrol N., Lott J.N.A., Azcón-Aguilar C., Peterson R.L. 2008.** Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Canadian Journal of Microbiology* **54**: 103-110.

**González-Guerrero M., Benabdellah K., Ferrol N., Azcón-Aguilar C. 2009.** Mechanisms underlying heavy metal tolerance in arbuscular mycorrhizas. Dans: Azcón-Aguilar C., Barea J.M., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. (eds) *Mycorrhizas - Functional processes and Ecological Impact*. Springer-Verlag, Germany, pp. 1-16.

**González-Guerrero M., Oger E., Benabdellah K., Azcón-Aguilar C., Lanfranco L., Ferrol N. 2010.** Characterization of a CuZn superoxide dismutase gene in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Current Genetics* **56**: 265-274.

**Govindarajulu M., Pfeffer P.E., Jin H., Abubaker J., Douds D.D., Allen J.W., Bücking H., Lammers P.J., Shachar-Hill Y. 2005.** Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature Letters* **435**: 819-823.

**Graham J.H., Hodge N.C., Morton J.B. 1995.** Fatty acid methyl ester profiles for characterization of Glomalean fungi and their endomycorrhizae. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 58-64.

**Gramss G., Voigt K.D., Firsche B. 1999.** Oxidoreductase enzymes liberated by plant roots and their effects on soil humic material. *Chemosphere* **38**: 1481-1494.

**Grandmougin-Ferjani A., Dalpé Y., Veignie E., Hartmann M-A., Rafin C., Sancholle M. 1995.** Infection by arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* of leek plants (*Allium porrum* L.): effects of lipids. Dans: Kader J.C., Mazliak P. (eds). *Physiology, biochemistry and molecular biology of plant lipids*. Kluwer Academic Publishers, pp. 444-446.

**Grandmougin-Ferjani A., Dalpé Y., Hartmann M-A., Laruelle F., Couturier D., Sancholle M. 1997.** Taxonomic aspects of the sterol and  $\Delta 11$ -hexadecenoic acid (C16:1,  $\Delta 11$ ) distribution in arbuscular mycorrhizal spores. Dans: Williams J.P., Khan M.U., Lem N.W. (eds). *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids*. Kluwer Academic Publishers, pp. 195-197.

**Grandmougin-Ferjani A., Dalpé Y., Hartmann M-A., Laruelle F., Sancholle M. 1999.** Sterol distribution in arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytochemistry* **50**: 1027-1031.

**Grandmougin-Ferjani A., Fontaine J., Durand R. 2005.** Carbon metabolism, lipid composition and metabolism in arbuscular mycorrhizal fungi. Dans: Declerck S., Strullu D-G., Fortin A. (eds). *In vitro Culture of Mycorrhizas*. Springer-Verlag, Germany, pp. 159-180.

**Green A. 1933.** The preparation of acetate and phosphate buffer solutions of known pH and ionic strength. *Journal of American Chemical Society* **55**: 2331-2336

**Grille S., Zaslowski A., Thiele S., Plat J., Warnecke D. 2010.** The functions of sterol glycosides come to those who wait: recent advances in plants, fungi, bacteria and animals. *Progress in Lipid Research* **49**: 262-288.

**Guether M., Neuhauser B., Balestrini R., Dynowski M., Ludewig U., Bonfante P. 2009a.** A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* **150**: 73-83.

**Guether M., Balestrini R., Hannah M., He J., Udvardi M.K., Bonfante P. 2009b.** Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytologist* **182**: 200-212.

**Günther T., Dornberger U., Fritsche W. 1996.** Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere* **33**: 203-215.

**Gurr M.I., Harwood J.L., Frayn, K.N. 2002.** *Lipid biochemistry: an introduction*, 5th edn. Oxford: Blackwell.

**Gutjahr C., Casieri L., Paszkowski U. 2009.** *Glomus intraradices* induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. *New Phytologist* **182**: 829-837.

**Gutteridge J.M., Halliwell B. 1989.** Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillière's clinical haematology* **2**: 195-256.

Gyuricza V., Declerck S., Dupré de Boulois H. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi decrease radiocesium accumulation in *Medicago truncatula*. *Journal of Environmental Radioactivity* **101**: 591-596.

## H

- Habe H., Omori T., 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience and Biotechnological Biochemistry* **67**: 225-243.
- Haemmerli W.H., Mattis S.A.L., Sanglard D., Fiechter A. 1986. Oxidation of benzo[a]pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry* **261**: 6900-6903.
- Hallé F., 2008. Aux origines des plantes, tome 1. Des plantes anciennes à la botanique du XXI<sup>ème</sup> siècle. Fayard, Paris.
- Hanes C. S., Isherwood, F.A. 1949. *Nature* **164**, 1107.
- Hanway J.J., Heidel H. 1952. Soil analysis methods as used in Iowa State College soil testing laboratory. *Iowa Agricultural News* **57**: 1-31.
- Haritash A.K., Kaushik C.P. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* **169**: 1-15.
- Harley J.L. 1984. The mycorrhizal associations. Dans: Linskens H.F., Heslop-HarriRon J. (eds) *Cellular interactions*. Springer-Verlag, Germany, pp. 148-186.
- Harley J. L., Smith S. E. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London.
- Harms H., Dehnen W., Moench W. 1977. Benzo[a]pyrene metabolites formed by plant cells. *Z. Naturforsch* **32c**: 321-326.
- Harrison A.F. 1987. Soil organic phosphorus: a review of world literature. Wallingford, CAB International.
- Harrison M.J. 1996. A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *The Plant Journal* **9**: 491-503.
- Harrison M.J., Van Buuren M.L. 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **378**: 626-629.
- Harrison M.J., Pumplin N., Breuillig F.J., Noar R.D., Park H-J. 2010. Phosphate transporters in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Dans: Koltai H., Kapulnik Y. (eds) *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and Function 2<sup>nd</sup> edition*. Springer Science + Business Media, pp. 117-136.
- Hata S., Kobae Y., Banba M. 2010. Chapter 1 - Interactions between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *International Review of Cell and Molecular Biology* **281**: 1-48.
- Hawkins H-J., Johansen A., George E. 2000. Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **226**: 275-285.
- Hayashi T., Banba M., Shimoda Y., Kouchi H., Hayashi M., Imaizumi-Anraku H. 2010. A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant Journal* **63**: 141-154.
- Hazledine S., Sun J., Wysham D., Downie J.A., Oldroyd G.E., Morris R. 2009. Nonlinear time series analysis of nodulation factor induced calcium oscillations: evidence for deterministic chaos? *PLoS One* **4**: 6637.
- He Z.Q., He C.X., Zhang Z.B., Zou Z.R., Wang H.S. 2007. Changes of antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscular mycorrhizae under NaCl stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **59**: 128-133.
- Heggo A., Angle J.S., Chaney R.L. 1990. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil Biology and Biochemistry* **22**: 865-869.
- Helber N., Wippel K., Sauer N., Schaarschmidt S., Hause B., Requena N. 2011. A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. *The Plant Cell* **23**: 3812-3823.
- Hewitt H.G. 1998. *Fungicides in Crop Protection*. CAB, Wallingford.
- Hijikata N., Murase M., Tani C., Ohtomo R., Osaki M., Ezawa T. 2010. Polyphosphate has a central role in the rapid and massive accumulation of phosphorus in extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* **186**: 285-289.
- Hijri M., Sanders I.R. 2004. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. *Fungal Genetics and Biology* **41**:253-261.
- Hildebrandt U., Kaldorf M., Bothe H. 1999. The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology* **154**: 709-717.
- Hildebrandt U., Regvar M., Bothe H. 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* **68**: 139-146.
- Ho I., Trappe J.M. 1973. Translocation of <sup>14</sup>C from *Festuca* plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature* **244**: 30.
- Hodge A., Campbell C.D., Fitter A.H. 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* **413**: 297-299.
- Hohnjec N., Perlick A.M., Pühler A., Küster H. 2003. The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene *MtSucSI* is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 903-915.
- Howard P.H., Meylan W.M. 1997. *Handbook of Physical Properties of Organic Chemicals*, Boca Raton, USA, pp. 232-286.

- Hoyau V., Iaffrezo J.L., Garrigues P., Clain M.P., Masclet P. 1996.** Deposition of aerosols in polar regions-contamination of the ice sheet by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycyclic Aromatic Compounds* **8**: 35-44.
- Huang X.D., Zeiler L.F., Dison D.G., Greenberg B.M. 1996.** Photo-induced toxicity of PAH to the foliar region of *Brassica napus* (canola) and *Cucumis sativus* (cucumber) in simulated solar radiation. *Ecotoxicology Environmental Safety* **35**: 190-197.

## I

- IARC (International Agency for Research on Cancer).** IARC Monographs volume 92.
- Ichimura Y., Kirisako T., Takao T., Satomi Y., Shimonishi Y., Ishihara N., Mizushima N., Tanida I., Kominami E., Ohsumi M., Noda T. Ohsumi Y. 2000.** A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**: 488-492.
- Imlay J.A., Lin S. 1988.** DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**: 1302-1309.
- Institut National de l'Environnement industriel et des Risques (INERIS). 2005.** Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques.
- Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS).** Fiche toxicologique du B[a]P ([http://www.step-cmr.fr/uploads/documents\\_utiles/fiches\\_toxicologiques/ft144.pdf](http://www.step-cmr.fr/uploads/documents_utiles/fiches_toxicologiques/ft144.pdf))
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 1983.** IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, polynuclear aromatic compounds part 1. *Chemical, Environmental and Experimental Data* **32**.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)** (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/steroid.htm>)

## J

- Jabaji-Hare S. 1988.** Lipid and fatty acid profiles of some vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: contribution to taxonomy. *Mycologia* **80**: 622-629.
- Jabaji-Hare S., Deschene A., Kendrick B. 1984.** Lipid content and composition of vesicles of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycologia* **76**: 1024-1030.
- Jakobsen I. 1995.** Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. Dans: Varma A., Hock B. (eds) *Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Springer-Verlag, Allemagne, pp. 297-325.
- Jakobsen I., Abbott L.K., Robson A.D. 1992.** External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 2. Hyphal transport of <sup>32</sup>P over defined distances. *New Phytologist* **120**: 509-516.
- Janoušková M., Pavlíková D., Vosátka M. 2006.** Potential contribution of arbuscular mycorrhiza to cadmium immobilisation in soil. *Chemosphere* **65**: 1959-1965.
- Jansa J., Gryndler M., Matucha M. 1999.** Comparison of the lipid profiles of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and soil saprophytic fungi. *Symbiosis* **26**: 247-264.
- Jany J-L., Pawlowska T.E. 2010.** Multinucleate spores contribute to evolutionary longevity of asexual Glomeromycota. *The American Naturalist* **175**: 424-435.
- Javot H., Pumplun N., Harrison M.J. 2007a.** Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles *Plant, Cell and Environment* **30**: 310-322.
- Javot H., Penmetsa R.V., Terzagui N., Cook D.R., Harrison M.J. 2007b.** A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *PNAS* **104**: 1720-1725.
- Jiang Y.F., Wang T., Wang F., Jia Y., Wu M.H., Sheng G.Y., Fu J.M. 2009.** Levels, composition profiles and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban soil of Shanghai, China. *Chemosphere* **75**: 1112-1118.
- Jin H., Pfeffer P.E., Douds D.D., Piotrowski E., Lammers P.J., Shachar-Hill Y. 2005.** The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **168**: 687-696.
- Jindal V., Atwal A., Sekhon B.S., Singh R. 1993.** Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on metabolism of moong plants under NaCl salinity. *Plant Physiology and Biochemistry* **31**: 475-481.
- Johansen A., Finlay R.D., Olsson P.A. 1996.** Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intradices*. *New Phytologist* **133**: 705-712.
- Joner E.J., Johansen A. 2000.** Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* **104**: 81-86.
- Joner E.J., Leyval C. 2001.** Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza* **10**: 155-159.
- Joner E.J., Ravnskov S., Jakobsen I. 2000.** Arbuscular mycorrhizal phosphate transport under monoxenic conditions using radio-labelled inorganic and organic phosphate. *Biotechnology Letters* **22**: 1705-1708.
- Joner E.J., Johansen A., Loibner A.P., De La Cruz M.A., Szolar O.H.J., Portal J-M., Leyval C. 2001.** Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environmental Science and Technology* **35**: 2773-2777.
- Joner E.J., Corgié S.C., Amellal N., Leyval C. 2002.** Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 859-864.

- Joner E.J., Leyval C. 2003.** Rhizosphere gradient of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environmental Science and Technology* **37**: 2371-2375.
- Joner E.J., Leyval C., Colpaert J.V. 2006.** Ectomycorrhizas impede phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) both within and beyond the rhizosphere *Environmental Pollution* **142**: 34- 38.
- Juge C., Coughlan A.P., Fortin J.A., Piché Y., 2009.** Growth and branching of asymbiotic, presymbiotic, and extraradical AM fungal hyphae: clarification of concepts and terminology. Dans: Khasa D., Piché Y., Coughlan A.P. (eds) *Advances in mycorrhizal Science and Technology*. National Research Council of Canada, CABI Publishing.
- Juhász A.L., 1998.** Microbial degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. Ph.D. Thesis, Victoria University of Technology, Melbourne, Australia.
- Juhász A.L., Naidu R. 2000.** Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation* **45**: 57-88.
- Jung M.C., Thornton I. 1996.** Heavy metal contamination of soils and plants in the vicinity of a lead-zinc mine, Korea. *Applied Geochemistry* **11**: 53-59.
- Jung S.C., García-Andrade J., Verhage A., Fernández I., García J.M., Azcón-Aguilar C., Pozo M.J. 2009.** Arbuscular mycorrhiza confers systemic resistance against *Botrytis cinerea* in tomato through priming of JA-dependent defense responses. Dans: Mauch-Mani B., Schmidt A. (eds) *Induced resistance: chances and limits*. IOBC/wprs Bulletin, Working Group "Induced resistance in plants against insects and diseases." Proceedings of the meeting at Granada, Espagne.
- Juniper S., Abbott L.K. 1993.** Vesicular-arbuscular mycorrhizas and soil salinity. *Mycorrhiza* **4**: 45-57.

## K

- Kacálková L., Tlustoš P. 2011.** The uptake of persistent organic pollutants by plants. *Central European Journal of Biology* **6**: 223-235.
- Kang H., Zhu H., Chu X., Yang Z., Yuan S., Yu D., Wang C., Hong Z., Zhang Z. 2011.** A novel interaction between CcAMK and a protein containing the Scythe N ubiquitin-like domain in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **155**: 1312-1324.
- Kanwischer M., Porfirova S., Bergmüller E., Dormann P. 2005.** Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. *Plant Physiology* **137**: 713-723.
- Karagiannidis N., Hadjisavva-Zinoviadi. 1998.** The mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* enhances growth, yield and chemical composition of a durum wheat variety in 10 different soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **52**: 1-7.
- Karakaya A., Yücesoy B., Turhan A., Erdem O., Urgaz S., Karakaya A.E. 1999.** Investigation of some immunological functions in a group of asphalt workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology* **135**: 43-47.
- Karandashov V., Bucher M. 2005.** Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Plant Science* **10**: 22-29.
- Karcher W., Fordham R.J., Dubois J.J., Glaude P.G.J.M., Lighthart J.A.M. 1985.** *Spectral Atlas of Polycyclic Aromatic Compounds*. Dordrecht, Allemagne.
- Kauppi B., Lee K., Carredano E., Parales R., Gibson D., Eklund H., Ramaswamy S. 1998.** Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure* **6**: 571-586.
- Keith L.H., Telliard W.A. 1979.** Priority pollutants. I- a perspective view. *Environmental Science and Technology* **13**: 416-423.
- Kerkenaar A., Barug D. 1984a.** Fluorescence microscope studies of *Ustilago maydis* and *Penicillium italicum* after treatment with imazalil or fenpropimorph. *Pest Management Science* **15**: 199-205.
- Kerkenaar A., Van Rossum J.M., Verslius G.G., Marsman J.W. 1984b.** Effect of fenpropimorph and imazalil in sterol biosynthesis in *Penicillium italicum*. *Pest Management Science* **15**: 177-187.
- Khalvati M.A., Hu Y., Mozafar A., Schmidhalter U., 2008.** Quantification of water uptake by arbuscular mycorrhizal hyphae and its significance for leaf growth, water relations, and gas exchange of barley subjected to drought stress. *Plant Biology* **7**: 706-712.
- Khaosaad T., Garcia-Garrido J.M., Steinkellner S., Vierheilig H. 2007.** Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 727-734.
- Kim S.J., Kweon O., Freeman J.P., Jones R.C., Adjei M.D., Jhoo J.W., Edmondson R.D., Cerniglia C.E. 2006.** Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low- and high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1045-1054.
- Koide R.T., Kabir Z. 2000.** Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *Biology and Fertility of Soils* **26**: 331-335.
- Kojima T., Hayatsy M., Saito M. 1998.** Intraradical hyphae phosphatase of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *Mycological Research* **108**: 610-615.
- Kolb M., Harms H. 2000.** Metabolism of fluoranthrene in different plant cell cultures and intact plant. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**: 1304-1310.



- Koltai H. 2011.** Strigolactones are regulators of root development. *New Phytologist* **190**: 545-549.
- Kornberg A., Rao N.N., Ault-Riche D. 1999.** Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry* **68**: 89-125.
- Koske R.E. 1981.** *Gigaspora gigantea*: observations on spore germination of a VA-mycorrhizal fungus. *Mycologia* **73**: 288-300.
- Kosuta S., Chabaud M., Lougnon G., Gough C., Dénarié J., Barker D.G., Bécard G. 2003.** A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **131**: 952-962.
- Kosuta S., Hazledine S., Sun J., Miwa H., Morris R.J., Downie J.A., Oldroyd G.E. 2008.** Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* **105**: 9823-9828.
- Krajinski F, Hause B, Gianinazzi-Pearson V, Franken P. 2002.** *Mth1*, a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue. *Plant Biology* **4**: 754-761.
- Krishna K.R., Bagyaraj D.J. 1984.** Growth and nutrient uptake of peanut inoculated with the mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* compared with non-inoculated ones. *Plant and Soil* **77**: 405-408.
- Kuhn G., Hijri M., Sanders I.R. 2001.** Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **414**:745-748.
- Kuhn H., Kister H., Requena N. 2010.** Membrane steroid-binding protein 1 induced by a diffusible fungal signals critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **185**: 716-733.
- Kumar P.B.A.N., Dushenkv V., Motto H., Raskin I. 1995.** Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* **29**: 1232-1238.
- Kummerová M., Kmentová E. 2004.** Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plant seedling. *Chemosphere* **56**: 387-393.

## L

- Labidi S., Ben Jeddi F., Tisserant B., Debiane D., Rezgui S., Grandmougin-Ferjani A. Lounès-Hadj Sahraoui A. 2012.** Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in root mineral uptake under CaCO<sub>3</sub> stress. *Mycorrhiza* **22**: 337-345.
- Laloi M., Perret A.M., Chatre L., Melser S., Cantrel C., Vaultier M.N., Zachowski A., Bathany K., Schmitter J.M., Vallet M. et al. 2007.** Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiology* **143**: 461-472.
- Lambert M., Kremer S., Sterner O., Anke H. 1994.** Metabolism of pyrene by the Basidiomycete *Crinipellis stipitaria* and identification of pyrenequinones and their hydroxylated precursors in strain JK375. *Applied en Environmental Microbiology* **60**: 3597-3601.
- Lammers P.J., Jun J., Abubaker J., Arreola R., Gopalan A., Bago B., Hernandez-Sebastia C. Allen J.W., Douds D.D., Pfeffer P.E. Shachar-Hill Y. 2001.** The glyoxylate cycle in arbuscular mycorrhizal fungus: gene expression and carbon flow. *Plant Physiology* **127**: 1287-1298.
- Lanfranco L., Bolchi A., Cesale Ros E., Ottonello S., Bonfante P. 2002.** Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Physiology* **130**: 58-67.
- Lanfranco L., Nevero M., Bonfante P. 2005.** The mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* processes a CuZn superoxide dismutase that is up regulated during symbiosis with legumes hosts. *Plant Physiology* **137**: 1319-1330.
- Lange B., Kremer S., Sterner O., Anke H. 1994.** Pyrene metabolism in *Crinipellis stipitaria*: identification of trans-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene and 1-pyrenesulfate in strain JK364. *Applied and Environment Microbiology* **60**: 3602-3607.
- Larsen J., Thingstrup I., Jakobsen I., Rosendhal S. 1996.** Benomyl inhibits phosphorus transport but not fungal alkaline phosphatase activity in a *Glomus*-cucumber symbiosis. *New Phytologist* **132**: 127-133.
- Larsen J., Olsson P.A., Jakobsen I. 1998.** The use of fatty acid signatures to study mycelial interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the saprophytic fungus *Fusarium culmorum* in root-free soil. *Mycological Research* **102**: 1491-1496.
- Laurent, P. 1995.** Contribution à l'étude des protéines régulées par la symbiose chez l'ectomycorhize d'*Eucalyptus* - *Pisolithus*. Caractérisation de mannoprotéines pariétales chez le basidiomycète *Pisolithus tinctorius*. Mémoire de thèse. University Henri Poincaré - Nancy I, Nancy.
- Le Tacon F. 1985.** Les mycorrhizes: une coopération entre plantes et champignons. *La Recherche* **16**: 624-632.
- Leake J.R.1994.** The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* **127**:171-216.
- Leduc B. 2007.** Impact de l'antracène, sur la germination des spores de deux espèces de champignons mycorrhiziens à arbuscules: *Glomus lamellosum* et *Glomus proliferum*. Rapport de stage de Master 2 Biologies et Biotechnologies, Université des Sciences et Technologies de Lille.
- Lee C.S., Lee Y.J., Jeun Y.C. 2005.** Observations of infection structures on the leaves of cucumber plants pre-treated with arbuscular mycorrhiza *Glomus intraradices* after challenge inoculation with *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Pathology Journal* **21**: 237-243.

- Lee Y.-J., George E. 2005. Contribution of mycorrhizal hyphae to the uptake of metal cations by cucumber plants at two levels of phosphorus supply. *Plant and Soil* **278**: 361-370.
- Lefebvre B., Furt F., Hartmann M.-A., Michaelson L.V., Carde J.-P., Sargueil-Boiron F., Rossignol M., Napier J.A., Cullimore J., Bessoule J.-J., Mongrand S. 2007. Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiology* **144**: 402-418.
- Lei J., Bécard G., Catford J.G., Piché Y. 1991. Root factors stimulate  $^{32}\text{P}$  uptake and plasmalemma ATPase activity in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* **118**: 289-294.
- Leray C. 2010. *Les lipides dans le monde vivant*. Lavoisier.
- Leroux P. 2003. Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. *Comptes Rendus de Biologie* **326**: 9-21.
- Leyval C. 2005. Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fung on heavy metal and radionucleid transfer to plants. Dans: Huang P.M., Gobran G.R (eds) Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere. Elsevier, pp 419-429.
- Leyval C., Binet P. 1998. Effect of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in soil on arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Environmental Quality* **25**: 212-219.
- Leyval C., Joner E.J., Del Val C., Haselwandter K. 2002. Potential of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. Dans: Gianinazzi S., Schüepp H., Barea J.-M., Haselwandter K. (eds). Mycorrhizal Technology in Agriculture: from genes to bioproducts. Birkhäuser, Springer Verlag.
- Li H.Y., Yang G.D., Shu H.R., Yang Y.T., Ye B.X., Nishida I., Zheng C.C. 2006. Colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* induces a defense response against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in the grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), which includes transcriptional activation of the class III chitinase gene VCH3. *Plant and Cell Physiology* **47**: 154-163.
- Liang Y., Zhang W., Chen Q., Liu Y., Ding R. 2006. Effect of exogenous silicon (Si) on  $\text{H}^+$ -ATPase activity, phospholipids and fluidity of plasma membrane in leaves of salt- stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environmental and Experimental Botany* **57**: 212-219.
- Lide D.R. 2005. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 86th Ed. Boca Raton, CRC Press, USA.
- Liste H.-H., Alexander M. 2000. Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere* **40**: 7-10.
- Liu A., Dalpé Y. 2009. Reduction in soil polycyclic aromatic hydrocarbons by arbuscular mycorrhizal leek plants. *International Journal of Phytoremediation* **11**: 39-52.
- Liu A., Hamel C., Hamilton R.I., Ma B.L., Smith D.L. 2000. Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. *Mycorrhiza* **9**: 331-336.
- Liu J., Blaylock L., Endre G., Cho J., Town C.D., VandenBosch K., Harrison M.J. 2003. Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Cell* **15**: 2106-2123.
- Liu J., Maldonado-Mendoza I., Lopez-Meyer M., Cheung F., Town C.D., Harrison M.J. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal* **50**: 529-544.
- Liu S.L., Luo Y.M., Cao Z.H., Wu L.H., Ding K.Q., Christie P. 2004. Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environmental Geochemistry and Health* **26**: 285-293.
- Livermore B.P., Johnson R.C., Jenkin H.M. 1969. Isolation of an unusual positional isomer of hexadecenoic acid from a parasitic leptospire. *Lipids* **4**: 166-167.
- Lodovici M., Luceri C., Guglielmi F., Bacci C., Akpan V., Fonnesu M.L., Boddi V., Dolara P. 2004. Benzo[a]pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, and *mEH*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **13**: 1342-1348.
- Logi C., Sbrana C., Giovannetti M. 1998. Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3473-3479.
- López-Pedrosa A., González-guerrero M., Valderas A., Azcón-Aguilar C., Ferrol N. 2006. *GintAMT1* encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* **43**: 102-110.
- Lösel D.M. 1988. Fungal lipids. Dans: Ratledge C., Wilkinson S.G. (eds) *Microbial lipids, Vol. 2*. Academic Press, UK, pp. 367-437.
- Lösel D.M., Cooper K.M. 1979. Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -labelled substrates by uninfected and VA mycorrhizal roots of onion. *New Phytologist* **83**: 415-426.
- Losi M.E., Amrhein C., Frankenberger W.T. 1994. Environmental biochemistry of chromium. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* **136**: 91-121.

## M

- Ma T.-H., Harris M.M., Anderson V.A. 1984. Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. *Mutation Research* **138**: 157-167.
- Maathuis F.J.M. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 250-258.



- Macek T., Mackova M., Kas J. 2000.** Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances* **18**: 23-34.
- Mackay D., Shiu W.Y., Ma K.C. 1992.** Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Volume I. Lewis Publishers.
- Madan R., Pankhurst C., Hawke B., Smith S. 2002.** Use of fatty acids for identification of AM fungi and estimation of the biomass of AM spores in soil. *Soil Biology & Biochemistry* **34**: 125-128.
- Maillet F., Poinot V., André O., Puech-Pagès V., Haouy A., Gueunier M., Cromer L., Giraudet D., Formey D., Niebel A., Martinez E.A., Driguez H., Bécard G., Dénarié J. 2011.** Fungal lipochitoooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**: 58-64.
- Maldonado-Mendoza I.E., Dewbre G.R., Harrison M.J. 2001.** A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 1140-1148.
- Maliszewska-Kordybach B., Klimkiewicz-Pawlas A., Smreczak B., Janusauskaite D. 2007.** Ecotoxicological effect of phenanthrene on nitrifying bacteria in soils of different properties. *Journal of Environmental Quality* **36**: 1635-1645.
- Manjarrez M., Smith F.A., Marschner P., Smith S.E. 2008.** Is cortical root colonization required for carbon transfer to arbuscular mycorrhizal fungi? Evidence from colonization phenotypes and spore production in the reduced mycorrhizal colonization (rmc) mutant of tomato. *Botany* **86**: 1009-1019.
- Markmann K., Giczey G., Parniske M. 2008.** Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. *PLoS Biology* **6**: e68.
- Marschner H. 1995.** Mineral Nutrition in Higher Plants. Academic Press, London, RU.
- Martin F., Tuskan G.A., DiFazio S.P., Lammers P., Newcombe G., Podila G.K. 2004.** Symbiotic sequencing for the populus mesocosm. *New Phytologist* **161**: 330-335.
- Martin S., Parton R.G. 2005.** Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **16**: 163-174.
- Martin S.W., Konopka J.B. 2004.** Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **3**: 675-684.
- Martos F. 2010.** Structuration écologique et évolutive des symbioses mycorrhiziennes des orchidées tropicales. Thèse de doctorat en Biologie des Populations et Ecologie de l'Université de La Réunion.
- Marulanda A., Azcón R., Ruiz-Lozano J.M. 2003.** Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum* **119**: 526-533.
- Marulanda A., Porcel R., Barea J.M., Azcón R. 2007.** Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive *Glomus* species. *Microbial Ecology* **54**: 543-552.
- Marx C., Dexheimer J., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. 1982.** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. IV. Ultracytoenzymological evidence (ATPase) for active transfer processes in the host-arbuscule interface. *New Phytologist* **90**: 37-43.
- Mastrangelo G., Fadda E., Marzia V. 1996.** Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environmental Health Perspectives* **104**: 1166-1170.
- Matsubara Y., Tamura H., Harada T. 1995.** Growth enhancement and *Verticillium* wilt control by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculation in eggplant. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **64**: 555-561.
- May W.E., Wasik S.P., Miller M.M., Tewari Y.B., Brown-Thomas J.M., Goldberg R.N. 1983.** Solution thermodynamics of some slightly soluble hydrocarbons in water. *Journal of Chemical & Engineering Data* **28**: 197-200.
- McGonigle T.P., Miller M.H., Evans D.G., Fairchild G.L., Swan J.A. 1990.** A method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **115**: 495-501.
- McKendrick S.L., Leake J.R., Read D.J. 2000.** Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytologist* **145**: 539-548.
- Menge J.A., Steirle D., Bagyaraj D.J., Johnson E.L.V., Leonard R.T. 1978.** Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytologist* **80**: 575-578.
- Mercer E.I. 1991.** Sterol biosynthesis inhibitors: their current status and modes of action. *Lipids* **26**: 584-597.
- Meyer J.R., Moser R., Neef A., Sthal U., Kampfer P. 1999.** Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiology* **145**: 1731-1741.
- Miller M.M., Wasik S.P., Huang G.-L., Shiu W.-Y., Mackay D. 1985.** Relationships between octanol-water partition coefficient and aqueous solubility. *Environmental Science and Technology* **19**: 522-529.
- Miller R.M., Reinhardt D.R., Jastrow J.D. 1995.** External hyphae production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia* **103**: 17-23.
- Mitchell H.J., Hall J.L., Barber M.S. 1994.** Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiology* **104**: 551-556.
- Mitsubishi N., Ohnishi M., Sekiguchi Y., Kwon Y.U., Chang Y.T., Chung S.K., Inoue Y., Reid R.J., Yagisawa H., Mimura T. 2005.** Phytic acid synthesis and vacuolar accumulation in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* induced by high concentration of inorganic phosphate and cations. *Plant Physiology* **138**: 1607-1614.

- Miya R.K., Firestone M.K. 2001.** Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender oat root exudates and root debris. *Journal of Environmental Quality* **30**: 911-1918.
- Mohammad M.J., Malkawi H.I., Shibli R. 2003.** Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus fertilization on growth and nutrient uptake of barley grown on soils with different levels of salts. *Journal of Plant Nutrition* **26**: 125-137.
- Molano J., Durán A., Cabib E. 1977.** A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Analytical Biochemistry* **83**: 648-656.
- Moller K., Kristensen K., Yohalem D., Larsen J. 2009.** Biological management of gray mold in pot roses by co-inoculation of the biocontrol agent *Ulocladium atrum* and the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Biological Control* **49**: 120-125.
- Mongrand S., Morel J., Laroche J., Claverol S., Carde J-P., Hartmann M-A., Bonneau M., Simon-Plas F., Lessire R., Bessoule J-J., 2004.** Lipid raft in higher plant cells: purification and characterization of triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 36277-36286.
- Mueller J.G., Middaugh D.P., Lantz S.E., Chapman P.J. 1991.** Biodegradation of creosote and pentachlorophenol in contaminated groundwater: chemical and biological assessment. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 1277-1285.
- Mueller K.E., Shann J.R. 2006.** PAH dissipation in spiked soil: impacts of bioavailability, microbial activity, and trees. *Chemosphere* **64**: 1006-1014.
- Mukherjee A., Ané J-M. 2011.** Germinating spore exudates from arbuscular mycorrhizal fungi: molecular and developmental responses in plants and their regulation by ethylene. *Molecular Plant Microbe Interactions* **24**: 260-270.
- Müller M.M., Kantola R., Kitanen V. 1994.** Combining sterol and fatty acid profiles for the characterization of fungi. *Mycological Research* **98**: 593-603.
- Müllner H., Daum G. 2004.** Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochimica Polonica* **51**: 323-347.
- Munné-Bosch S. 2005.** The role of  $\alpha$ -tocopherol in plant stress. *Journal of Plant Physiology* **162**: 743-748.
- Munnick T. 2001.** Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends in Plant Science* **6**: 227-233.
- Münzenberger B., Kottke I., Oberwinkler F. 1992.** Ultrastructural investigations of *Arbutus unedo*-*Laccaria amethystea* mycorrhiza synthesized *in vitro*. *Trees - Structure and Function* **7**: 40-47.
- Muratova A., Pozdnyakova N., Golubev S., Wittenmayer L., Makarov O., Merach W., Tirkovskaya O. 2009a.** Oxidoreductase activity of sorghum root exudates in a phenanthrene-contaminated environment. *Chemosphere* **74**: 1031-1036.
- Muratova A., Golubev S., Wittenmayer L., Dmitrieva T., Bondarenkova A., Hirshe F., Merbach W., Turkovskaya O. 2009b.** Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene on root exudation *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Environmental and Experimental Botany* **66**: 514-521.
- Murphy D.J. 1991.** Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Progress in Lipid Research* **29**: 299-324.
- Murphy D.J. 2001.** Biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in Lipid Research* **40**: 325-438.
- Murphy D.J. 2012.** The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archae to mammals. *Protoplasma* **249**: 541-585.
- Murphy D.J., Vance J. 1999.** Mechanisms of lipid-body formation. *Trends in Biochemical Sciences* **24**: 109-115.
- Mysyakina I.S., Funtikova N.S. 2007.** The role of sterols in morphogenetic processes and dimorphism in fungi. *Microbiology* **76**: 1-13.
- Mysyakina I.S., Feofilova E.P. 2011.** The role of lipids in the morphogenetic processes of mycelial fungi. *Microbiology* **80**: 297-306.

## N

- Nagahashi G., Douds D.D. 2000.** Partial separation of root exudate and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycological Research* **104**: 1453-1464.
- Nagahashi G., Doner L., Abney G., Tsao A. 1993.** The low temperature, rapid dissolution of gellan away from root cultures. *Chemistry and Materials Science* **7**: 467-472.
- Nagy S., Nordby H.E., Nemeč S. 1980.** Composition of lipids in roots of six citrus cultivars infected with the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*. *New Phytologist* **85**: 377-384.
- Nakas J.P., Hagedorn C. 1990.** Biotechnology of plant-microbe interactions. McGraw-Hill, USA.
- Nam K., Kim J.Y., 2002.** Role of loosely bound humic substances and humin in the bioavailability of phenanthrene aged in soil. *Environmental Pollution* **118**: 427-433.
- Nemeč S. 1981.** Histochemical characteristics of *Glomus etunicatus* infection of *Citrus limon* fibrous roots. *Canadian Journal of Botany* **59**: 609-617.
- Newman E.I. 1966.** A method of estimating total of roots in a sample. *Journal of Ecology* **3**: 139-145.
- Ngosong C., Jarosch M., Raupp J., Neumann E., Ruess L. 2010.** The impact of farming practice on soil microorganisms and arbuscular mycorrhizal fungi: crop type versus long-term mineral and organic fertilization. *Applied Soil Ecology* **46**: 134-142.
- Nichols P., Stulp B.K., Jones J.G., White D.C. 1986.** Comparison of fatty acid content and DNA homology of the filamentous gliding bacteria *Vitreoscilla*, *Flexibacter*, *Filibacter*. *Archives of Microbiology* **146**: 1-6.

- Nielsen T., Jorgensen H.E., Larsen J.C., Poulsen M. 1996.** City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and others mutagens: occurrence, source and health effects. *Science of Total Environment* **189/190**: 41-49.
- Nikolaou K., Masclet P., Mouvier G. 1984.** Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere - a critical review. *Science of the Total Environment* **32**: 103-132.
- Nilsson L.O., Giesler R., Bååth E., Wallander H. 2005.** Growth and biomass of mycorrhizal mycelia in coniferous forests along short natural nutrient gradients. *New Phytologist* **165**: 613-622.
- Nordby H.E., Nemeč S., Nagy S. 1981.** Fatty acids and sterols associated with citrus roots mycorrhizae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **29**: 396-401.

## O

- O'Herlihy E.A., Duffy E.M., Cassells A.C. 2003.** The effect of arbuscular mycorrhizal fungi and chitosan sprays on yield and late blight resistance in potato crops from microplants. *Folia Geobotanica* **38**: 201-207.
- O'Neil M.J. 2006.** *The Merck Index*, 14th Ed., Whitehouse Station, USA, Merck & Co.
- Ocón A., Hampp R., Requena N. 2008.** Trehalose turnover during abiotic stress in arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **174**: 879-891.
- Oehl F., Alves da Silva G., Goto B.T., Costa Maia L., Sieverding E. 2011.** Glomeromycota: two new classes and a new order. *Mycotaxon* **116**: 365-379.
- Oger E., Ghignone S., Campagnac E., Fontaine J., Grandmougin-Ferjani A., Lanfranco L. 2009.** Functional characterization of a C-4 sterol methyl oxidase from the endomycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Fungal genetics and Biology* **46**: 486-495.
- Ohlroge J., Browse J. 1995.** Lipid biosynthesis. *The Plant Cell* **7**: 957-970.
- Ohtomo R., Saito M. 2005.** Polyphosphate dynamics in mycorrhizal roots during colonization of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* **167**: 571-578.
- Ojala J.C., Jarrell W.M., Menge J.A., Johnson E.L.V. 1983.** Influence of mycorrhizal fungi on the mineral nutrition and yield of onion in saline soil. *Agronomy Journal* **75**: 255-259.
- Oláh B., Brière C., Bécard G., Dénarié J., Gough C. 2005.** Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signaling pathway. *Plant Journal* **44**: 195-207.
- Oldroyd G.E.D., Downie J.A. 2006.** Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 351-357.
- Olsson P.A. 1999.** Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology* **29**: 303-310.
- Olsson P.A., Johansen A. 2000.** Lipid and fatty acid composition of hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi at different growth stages. *Mycological Research* **104**: 429-434.
- Olsson P.A., Wilhelmsson P. 2000.** The growth of external AM fungal mycelium in sand dunes and in experimental systems. *Plant and Soil* **226**: 161-169.
- Olsson P.A., Bååth E., Jakobsen I., Söderström B. 1995.** The use of phospholipid and neutral lipid fatty acids to estimate biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Mycological Research* **99**: 623-629.
- Olsson P.A., Van Aarle I.M., Allaway W.G., Ashford A.E., Rouhier H. 2002.** Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures. *Plant Physiology* **130**: 1162-1171.
- Olsson P.A., Larsson L., Bago B., Wallander H., Van Aarle I.M. 2003.** Ergosterol and fatty acids for biomass estimation of mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **159**: 7-10.
- Olsson P.A., Rahm J., Aliasgharzad N. 2010.** Carbon dynamics in mycorrhizal symbioses is linked to carbon costs and phosphorus benefits. *FEMS Microbiology and Ecology* **72**: 123-131.
- Op den Camp R., Streng A., De Mita S., Cao Q., Polone E., Liu W., Ammiraju J.S., Kudrna D., Wing R., Untergasser A., Bisseling T., Geurts R. 2011.** LysM-type mycorrhizal receptor recruited for rhizobium symbiosis in nonlegume *Parasponia*. *Science* **331**: 909-912.
- Ouziad F., Hildebrandt U., Schmelzer E., Bothe H. 2005.** Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology* **162**: 634-649.
- Ovchinnikova E., Journet E.P., Chabaud M., Cosson V., Ratet P., Duc G., Fedorova E., Liu W., Op den Camp R., Zhukov V., Tikhonovich I., Borisov A., Bisseling T., Limpens E. 2011.** IPD3 Controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in *Pea* and *Medicago* Spp. *Molecular Plant Microbe Interactions* **24**: 1333-1344.

## P

- Palayer J. 1997.** Les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Agence de l'Eau Seine-Normandie. 20814: 1-63.

- Parks L.W., Weete J.D. 1991.** Fungal sterols. Dans: Patterson G.W., Nes W.D. (eds) *Physiology and Biochemistry of sterols*. American Oil Chemist's Society, USA. Chapitre 6, pp. 158-171.
- Parniske M. 2008.** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews: Microbiology* **6**: 763-775.
- Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunand C. 2005.** Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* **24**: 255-265.
- Paszkowski U. 2006.** A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* **172**: 35-46.
- Patri M., Padmini A., Babu P.P. 2009.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in air and their neurotoxic potency in association with oxidative stress; a brief perspective. *Annals of Neurosciences* **16**: 22-30.
- Pawlowska T.E., Charvat I. 2004.** Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 6643-6649.
- Pawlowska T.E., Taylor J.W. 2004.** Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **427**: 733-737.
- Pawlowska T.E., Blaszkowski J., Rühling Å. 1996.** The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland. *Mycorrhiza* **6**: 499-505.
- Pearson J.N., Jakobsen I. 1993.** The relative contribution of hyphae and roots to phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizal plants, measured by dual labelling with <sup>32</sup>P and <sup>33</sup>P. *New Phytologist* **124**: 489-494.
- Penning T.M., Burczynski M.E., Hung C-F., McCoull K.D., Palackal N.T., Tsuruda L.S. 1999.** Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active *o*-quinones. *Chemical Research in Toxicology* **12**: 1-18.
- Pérez-Tienda J., Testillano P.S., Balestrini R., Fiorilli V., Azcón-Aguilar C., Ferrol N. 2011.** *GintAMT2*, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 1044-1055.
- Peyronel B., Fassi B., Fontana A., Trappe J. M. 1969.** Terminology of mycorrhizae. *Mycologia* **61**: 410-411.
- Pfeffer P.E., Shachar-Hill Y., Bécard G., Rolin D., Doude D.D. 1997.** Nutrient transport and metabolism in the life cycle of arbuscular mycorrhizae as examined by NMR spectroscopy. Dans: Flores E.S., Lynch J.P., Eissenstat D. (eds). *Radical biology: advances and perspectives on the function of plant roots*. American Society of Plant Physiologists, pp 187-209.
- Pfeffer P.E., Doude D.D., Bécard G., Shachar-Hill Y. 1999.** Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* **120**: 587-598.
- Pfeffer P.E., Doude D.D., Bücking H., Schwartz D.P., Shachar-Hill Y. 2004.** The fungus does not transfer carbon to or between roots in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **163**: 617-627.
- Phillips J.M., Hayman D.S. 1970.** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**: 158-161.
- Pike L.J. 2006.** Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research* **47**: 1597-1598.
- Pilon-Smits E. 2005.** Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 15-39.
- Pinhero R.G., Fletcher R.A. 1994.** Paclobutrazol and ancymidol protect corn seedlings from high and low temperature stresses. *Plant Growth regulation* **15**: 47-53.
- Pinsirodom P., Parkin K.L. 2001.** Lipase assay. Dans: Wrolstad R.E., Acree T.E., Decker E.A., Penner M.H., Reid D.S., Schwartz S.J., Shoemaker C.F., Smith D.M., Sporns P. (eds) *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons, Inc, New York, USA.
- Pirozynski K.A., Malloch D.W. 1975.** Origin of land plants - matter of mycotrophism. *BioSystems* **6**: 153-164.
- Pitman M., Läuchli A. 2002.** Global impact of salinity and agricultural ecosystems. Dans: Läuchli A., Lüttge U. (eds) *Salinity: environment-plants-molecules*. Springer, Netherlands, pp 3-20.
- Plenchette C., Fortin J.A., Furlan V. 1983.** Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant and Soil* **70**: 199-209.
- Porcel R., Ruiz-Lozano J.M. 2004.** Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1743-1750.
- Porcel R., Aroca R., Cano C., Bago A., Ruiz-Lozano J.M. 2006.** Identification of a gene from the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* encoding for a 14-3-3 protein that is up-regulated by drought stress during the AM symbiosis. *Microbial Ecology* **52**: 575-582.
- Porcel R., Aroca R., Cano C., Bago A., Ruiz-Lozano J.M. 2007.** A gene from the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* encoding a binding protein is up-regulated by drought stress in some mycorrhizal plants. *Environmental and Experimental Botany* **60**: 251-256.
- Porcel R., Aroca R., Ruiz-Lozano J.M. 2012.** Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**: 181-200.
- Porfirova S., Bergmuller E., Tropf S., Lemke R., Dormann P. 2002.** Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A* **99**: 12495-12500.

- Pothuluri J.V., Sely A., Evans F.E., Freeman J.P., Cerniglia C.E. 1995.** Transformation of chrysene and other polycyclic aromatic hydrocarbon mixture by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Revue Canadienne de Botanique* **73**: 1025-1033.
- Potin O., Veignie E., Rafin C. 2004.** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology* **51**: 71-78.
- Pozo M.J., Azcón-Aguilar C. 2007.** Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 393-398.
- Pozo M.J., Azcón-Aguilar C., Dumas-Gaudot E., Barea J.M. 1999.**  $\beta$ 1,3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Science* **141**: 149-157.
- Pozo M.J., Cordier C., Dumas-Gaudot E., Gianinazzi S., Barea J.M., Azcon-Aguilar C. 2002.** Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 525-534.
- Pozo M.J., Verhage A., García-Andrade J., García J.M., Azcón-Aguilar C. 2009.** Priming plant defence against pathogens by arbuscular mycorrhizal fungi. Dans: Azcón-Aguilar C., Barea J.M., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. (eds) *Mycorrhizas: functional processes and ecological impact*. Springer-Verlag, Allemagne, Chapitre 9, pp. 123-135.
- Pradhan S.P., Conrad J.R., Paterek J.R., Srivastava V.J. 1998.** Potential of phytoremediation for treatment of PAHs in soil at MGP sites. *Journal of Soil Contamination* **7**: 467-480.
- Pumplin N., Harrison M.J. 2009.** Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* **151**: 809-819.

## R

- Rabie G.H., 2005.** Role of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of soil rhizosphere spiked with poly aromatic hydrocarbons. *Mycobiology* **33**: 41-50.
- Rafin C., Veignie E., Woisel P., Cazier F., Surpateanu G. 2006.** New potential of a Deuteromycete fungus *Fusarium solani* in benzo[a]pyrene degradation: an eco-physiological hypothesis? Dans: Glaze M.P. (ed) *New Frontiers in Environmental Research*. Nova Science Publishers, Inc, New York, USA, pp. 165-179.
- Ramoliya P.J., Patel H.M., Pandey A.N. 2004.** Effect of salinization of soil on growth and macro- and micro-nutrient accumulation in seedlings of *Salvadora persica* (Salvadoraceae). *Forest Ecology and Management* **202**: 181-193.
- Ramos A.C., Façanha A.R., Feijó J.A. 2008.** Proton (H<sup>+</sup>) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **178**: 177-188.
- Rasmussen H.N. 1995.** Terrestrial orchids : from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press.
- Rasmussen H.N. Rasmussen F.N. 2009.** Orchid mycorrhiza : implications of a mycophagous life style. *Oikos* **118**:334-345.
- Rasmussen N., Lloyd D.C., Ratcliffe R.G., Hansen P.E., Jakobsen I. 2000.** P-31 NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **226**: 245-253.
- Ravnskov S., Wu Y., Graham J.H. 2003.** Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect expression of genes coding for sucrose synthases in maize roots. *New Phytologist* **157**: 539-545.
- Redecker D., Kodner R., Graham L.E. 2000.** Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* **289**: 1920-1921.
- Regvar M., Groznik N., Goljevšček, K., Gogala N. 2001.** Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi form various disturbed ecosystems in Slovenia. *Acta Biologica Slovenica* **44**: 27-34.
- Rehmann K., Noll H.P., Steiberg C.E.W., Kettrup A.A. 1998.** Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. Strain KR2. *Chemosphere* **36**: 2977-2992.
- Reich M., Göbel C., Kohler A., Buée M., Martin F., Feussner I., Polle A. 2009.** Fatty acid metaolism in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytologist* **182**: 950-964.
- Reilley K.A., Banks M.K., Schwab A.P. 1996.** Organic chemicals in the environment: dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *Journal of Environmental Quality* **25**: 212-219.
- Reinhardt D. 2007.** Programming good relations-development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 98-105.
- Reissig J.L., Strominger J.L., Ieloir L.F. 1955.** A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. *The Journal of Biological Chemistry* **217**: 959-966.
- Remy W., Taylor T.N., Hass H., Kerp H. 1994.** Four-hundred-million-year-old vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **91**: 11841-11843.
- Repetto O., Bestel-Corre G., Dumas-Gaudot E., Berta G., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. 2003.** Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. *New Phytologist* **157**: 555-567.
- Requena N., Breuninger M., Franken P., Ocón A. 2003.** Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology* **132**: 1540-1549.
- Requena N., Mann P., Franken C. 2000.** A homologue of the cell-cycle check-point TOR2 from yeast exist in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Protoplasma* **211**: 89-98.

- Requena N., Serrano E., Ocón A., Breuninger M. 2007.** Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* **68**: 33-40.
- Rezec J., in der Wiesche C., Mackova M., Zadrazil F., Macek T. 2008.** The effect of ryegrass (*Lolium perenne*) on decrease of PAH content in long term contaminated soil. *Chemosphere* **70**: 1603-1608.
- Richardson A.E., Hocking P.J., Simpson R.J., George T.S. 2009.** Plant mechanisms to optimise access to soil phosphorus. *Crop & Pasture Science* **60**: 124-143.
- Richez E. 2000.** Germination et croissance de graminées sur des sols pollués par des hydrocarbures aromatiques polycycliques: implications en écotoxicologie et en phytomanagement. Thèse de l'Université du Littoral Côte d'Opale en Science de la Vie.
- Rillig M.C., Wright S.F., Eviner V.T. 2002.** The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant and Soil* **238**: 325-333.
- Riser-Roberts E. 1998.** Remediation of petroleum-contaminated soils: biological, physical and chemical processes. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Rivera-Becerril F., Calantzis C., Turnau K., Caussanel J-P., Belinov A.A., Gianinazzi S., Strasser R.J., Gianinazzi-Pearson V. 2002.** Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1177-1185.
- Rivera-Becerril F., Metwally A., Martin-Laurent F., Van Tuinen D., Dietz K-J., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. 2005.** Molecular responses to cadmium in roots of *Pisum sativum* L. *Water, Air, and Soil Pollution* **168**: 171-186.
- Roberts M.R., Salinas J., Collinge D.B. 2002.** 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress. *Plant Molecular Biology* **1031**: 1031-1039.
- Roche Y., Gerbeau-Pissot P., Buhot B., Thomas D., Bonneau L., Gresti J., Mongrand S., Perrier-Cornet J-M., Simon-Plas F. 2008.** Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *The FASEB Journal* **22**: 3980-3991.
- Rodríguez L., Ruiz E., Alonso-Azcárate J., Rincón J. 2009.** Heavy metal distribution and chemical speciation in tailings and soils around a Pb-Zn mine in Spain. *Journal of Environmental Management* **90**: 1106-1116.
- Roitsch T., González M-C. 2004.** Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* **9**: 606-613.
- Rombaut R., Camp J.V., Dewettinck K., 2005.** Analysis of phospho- and sphingolipids in dairy products by a new HPLC method. *Journal of Dairy Science* **88**: 482-488.
- Roussel H., Van Tuinen D., Franken P., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. 2001.** Signalling between arbuscular mycorrhizal fungi and plants: identification of a gene expressed during early interactions by differential RNA display analysis. *Plant and Soil* **232**: 13-19.
- Rufyikiri G., Thiry Y., Declerck S. 2003.** Contribution of hyphae and roots to uranium uptake and translocation by arbuscular mycorrhizal carrot roots under root-organ culture conditions. *New Phytologist* **158**: 391-399.
- Rugh C.L. 2004.** Genetically engineered phytoremediation: one man's trash is another man's transgene. *TRENDS in Biotechnology* **22**: 496-498.
- Ruiz-Lozano J.M., Azcon R., Gomez M. 1995.** Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 456-460.
- Ruiz-Sánchez M., Aroca R., Muñoz Y., Polón R., Ruiz-Lozano J.M. 2010.** The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. *Journal of Plant Physiology* **167**: 862-869.

## S

- Saito K., Yoshikawa M., Yano K., Miwa H., Uchida H., Asamizu E., Sato S., Tabata S., Imaizumi-Anraku H., Umehara Y., Kouchi H., Murooka Y., Szczyglowski K., Downie J.A., Parniske M., Hayashi M., Kawaguchi M. 2007.** NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **19**: 610-624.
- Sakaki T., Zähringer U., Warnecke D.C., Fahl A., Knogge W., Heinz E. 2001.** Sterol glycosides and cerebrosides accumulate in *Pichia pastoris*, *Rhynchosporium secalis* and other fungi under normal conditions or under heat shock and ethanol stress. *Yeast* **18**: 679-695.
- Salt D.E., Smith R.D., Raskin I. 1998.** Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 643-668.
- Salvioli A., Chiapello M., Fontaine J., Lounes-Hadj Sahraoui A., Grandmougin-Ferjani A., Lanfranco L., Bonfante P. 2010.** Endobacteria affect the metabolic profile of their host *Gigaspora margarita*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Environmental Microbiology* **12**: 2083-2095.
- Sánchez-Blanco M.J., Ferrández T., Morales M.A., Morte A., Alarcón J.J. 2004.** Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomus deserticola* under drought conditions. *Journal of Plant Physiology* **161**: 675-682.

- Sancholle M., Dalpé Y. 1993.** Taxonomic relevance of fatty acids of arbuscular mycorrhizal fungi and related species. *Mycotaxon* **49**: 187-193.
- Sancholle M., Dalpé Y., Grandmougin-Ferjani A. 2001.** Lipids of mycorrhizae. Dans: Esser K. et Hock B. (eds) *The Mycota IX*. Fungal Association. Springer-Verlag, Germany, pp 63-93.
- Sandermann H. 1994.** Higher plant metabolism of xenobiotics: the "green liver" concept. *Pharmacogenetics* **4**: 225-241.
- Sanyal S.K., De Datta S.K. 1991.** Chemistry of phosphorus transformations in soil. *Advances in Soil Sciences* **16**: 1-50.
- Schaarschmidt S., Roitsch T., Hause B. 2006.** Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of Experimental Botany* **57**: 4015-4023.
- Schaarschmidt S., González M-C., Roitsch T., Strack D., Sonnewald U., Hause B. 2007a.** Regulation of arbuscular mycorrhization by carbon. The symbiotic interaction cannot be improved by increased carbon availability accomplished by root-specifically enhanced invertase activity. *Plant Physiology* **143**: 1827-1840.
- Schaarschmidt S., Kopka J., Ludwig-Müller J., Hause B. 2007b.** Regulation of arbuscular mycorrhization by apoplastic invertases: enhanced invertase activity in the leaf apoplast affects the symbiotic interaction. *The Plant Journal* **51**: 390-405.
- Schachtschabel P., Blume H.P., Brummer G., Hartge K.H., Schwertmann U. 1992.** Lehrbuch der Bodenkunde, 13<sup>th</sup> edition. Stuttgart, Germany: F. Enke Verlag.
- Schenck N.C., Smith G.S. 1982.** Additional new and unreported species of mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Florida. *Mycologia* **74**: 77-92.
- Schmitz O., Danneberg G., Hundeshagen B., Klingner A., Bothe H. 1991.** Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhiza by biochemical parameters. *Journal of Plant Physiology* **139**: 106-114.
- Schnoor J.L., Licht L.A., McCutcheon S.C., Wolfe N.L., Carreira L.H. 1995.** Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science and Technology* **29**: 318-323.
- Schoknecht J.D., Hattingh M.J. 1976.** X-ray microanalysis of elements in cells of VA mycorrhizal and nonmycorrhizal onions. *Mycologia* **68**: 296-303.
- Schreiner R.P., Bethlenfalvay G.J. 1995.** Mycorrhizal interactions in sustainable agriculture. *Critical Reviews in Biotechnology* **15**: 271-285.
- Schubert A., Allara P., Morte A. 2003.** Cleavage of sucrose in roots of soybean (*Glycine max*) colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* **161**: 495-501.
- Schubert A., Wyss P., Wiemken A. 1992.** Occurrence of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and in mycorrhizal roots. *Journal of Plant Physiology* **140**: 41-45.
- Schübler, A. 2002.** Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **244**: 75-83.
- Schübler A., Walker C. 2010.** The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. 59 p.
- Schübler A., Schwarzott D., Walker C. 2001.** A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**: 1413-1421.
- Schübler A., Martin H., Cohen D., Fitz M., Wipf D. 2006.** Characterization of carbohydrate transporter from symbiotic Glomeromycotan fungi. *Nature* **444**: 933-936.
- Schübler A., Martin H., Cohen D., Fitz M., Wipf D. 2007.** Studies on the Geosiphon symbiosis lead to the characterization of the first Glomeromycotan sugar transporter. *Plant Signaling and Behavior* **2**: 314-317.
- Schwab A.P., Banks M.K. 1994.** Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root zone. Dans: Anderson T.A., Coats J.R. (eds) *Bioremediation through rhizosphere technology*. American Chemical Society.
- Sędziewska K.A., Fuchs J., Tensch E.M., Baronian K., Watzke R., Kunze G. 2011.** Estimation of the *Glomus intraradices* nuclear DNA content. *New Phytologist* **192**: 794-797.
- Selosse M.A., Wei M., Jany J.L., Tillier A. 2002.** Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) LCM Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology* **11**: 1831-1844.
- Sen R., Hepper C.M. 1986.** Characterization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp) by selective enzyme staining following polyacrylamide gel electrophoresis. *Soil Biology and Biochemistry* **18**: 29-34.
- Shachar-Hill Y., Pfeffer P.E., Douds D.D., Osman S.F., Doner L.W., Ratcliffe R.G. 1995.** Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiology* **108**: 7-15.
- Shalaby M. 2003.** Responses of arbuscular mycorrhizal fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soil to Zn, Cd, Pb and their interactions *in vitro*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **6**: 1416-1422.
- Shao H-B., Guo Q-J., Chu L-Y., Zha X-N., Su Z-L., Hu Y-C., Cheng J-F. 2007.** Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids Surfaces - B: Biointerfaces* **54**: 37-45.
- Sharifi M., Ghorbanli M., Ebrahimzadeh H. 2007.** Improved growth of salinity-stressed soybean after inoculation with salt pre-treated mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology* **164**: 1144-1151.
- Sheng M., Tang M., Chen H., Yang B., Zhang F., Huang Y. 2008.** Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza* **18**: 287-296.



- Shibata R., Yano K. 2003.** Phosphorus acquisition from nonlabile sources in peanut and pigeonpea with mycorrhizal interaction. *Applied Soil Ecology* **24**: 133-141.
- Shimp J.F., Tracy J.C., Davis L.C., Lee E., Huang W., Erickson L.E., Schnoor J.L. 1993.** Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials. *Environmental Science and Technology* **23**: 41-77.
- Shuttleworth K., Cerniglia C.E. 1995.** Environmental aspects of PAH biodegradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **54**: 291-302.
- Siasou E., Standing D., Killham K., Johnson D. 2009.** Mycorrhizal fungi increase biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology & Biochemistry* **41**: 1341-1343.
- Siciliano S.D., Germida J.J. 1998.** Degradation of chlorinated benzoic acid mixtures by plant-bacteria associations. *Toxicology and Chemistry* **17**: 728-733.
- Siciliano V., Genre A., Balestrini R., Cappellazzo G., DeWit P.J.G.M., Bonfante P. 2007.** Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. *Plant Physiology* **144**: 1455-1466.
- Sieverding E., 1991.** Vesicular-arbuscular mycorrhiza management, technical cooperation-federal republic of German, Eschborn.
- Simonich S.L., Hites R.A. 1994.** Vegetation - atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* **28**: 939-943.
- Simon-Plas F., Mongrand S., Wipf D. 2011.** Regulation of plant transporters by lipids and microdomains. *Transporters and pumps in plant signaling* **7**: 353-377.
- Sims R.C., Overcash M.R. 1983.** Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Residue Reviews* **88**: 1-68.
- Singer A.C., Crowley D.E., Thompson I.P. 2003.** Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology* **21**: 123-130.
- Smith F.A., Smith S.E. 1997.** Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* **137**: 373-388.
- Smith S.E., Gianinazzi-Pearson V. 1990.** Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L.: effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Australian Journal of Plant Physiology* **17**: 177-188.
- Smith S.E., Read D. 1997.** Mycorrhizal symbiosis, second ed. Academic Press, New York.
- Smith S.E., Read D. 2008.** Mycorrhizal Symbiosis, third ed. Academic Press, New York.
- Smith S.E., Smith F.A. 1990.** Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytologist* **114**: 1-38.
- Smith S.E., Smith F.A. 2012.** Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* **104**: 1-13.
- Smith S.E., Smith F.A., Jakobsen I. 2003.** Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology* **133**: 16-20.
- Smith S.E., Smith F.A., Jakobsen I. 2004.** Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist* **162**: 511-524.
- Smith S.E., Jakobsen I., Grønlund M., Smith F.A. 2011.** Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiology* **156**: 1050-1057.
- Smithgall T.E., Harvey R.G., Penning T.M. 1988.** Spectroscopic identification of *ortho*-quinones as the products of polycyclic aromatic *trans*-dihydrodiol oxidation catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. A potential route of proximate carcinogen metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **263**: 1814-1820.
- Sokolski S., Dalpé Y., Séguin S., Khasa D., Lévesque C.A., Piché Y. 2010.** Conspecificity of DAOM 197198, the model arbuscular mycorrhizal fungus, with *Glomus irregulare*: molecular evidence with three protein-encoding genes. *Botany* **88**: 829-838.
- Solaiman M.D.Z., Saito M. 1997.** Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by respirometry. *New Phytologist* **136**: 533-538.
- Solaiman M.Z., Ezawa T., Kojima T., Saito M. 1999.** Polyphosphates in intraradical and extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 5604-5606.
- Song F.Q., Kong X.S. 2012.** Molecular process of arbuscular mycorrhizal associations and the symbiotic stabilizing mechanisms. *African Journal of Microbiology Research* **6**: 870-880.
- Sorger D., Athenstaedt K., Hrstnik C., Daum G. 2004.** A yeast strain lacking lipid particles bears a defect in ergosterol formation. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 31190-31196.
- St-Arnaud M., Hamel C., Caron M., Fortin J.A. 1995.** Endomycorrhizes VA et sensibilité des plantes aux maladies: synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels. Fortin J.A., Charest C., Piché Y. (eds). La symbiose mycorrhizienne, état des connaissances. Orbis Publishing, pp 51-87.
- Sterckeman T., Ouvrard S., Leglise P. 2012.** Phytoremédiation des sols. Dossiers techniques de l'ingénieur, Edition T.I., Centre de documentation Brabois.



- Stockinger H., Walker C., Schüßler A. 2009.** *Glomus intraradices* DAOM 197198, a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist* **183**: 1176-1187.
- Strack D., Fester T., Hause B., Schliemann W., Walter M.H. 2003.** Review paper: arbuscular mycorrhiza: biological, chemical and molecular aspects. *Journal of Chemical Ecology* **29**: 1955-1979.
- Stracke S., Kistner C., Yoshida S., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Szczygłowski K., Parniske M. 2002.** A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**: 959-962.
- Strullu D-G., Diop T., Plenchette C. 1997.** Réalisation de collections *in vitro* de *Glomus intraradices* (Schenck et Smith) et *Glomus versiforme* (Karsten et Berch) et proposition d'un cycle de développement. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **320**: 41-47.
- Stukenbrock E.H., Rosendahl S. 2005.** Clonal diversity and population genetic structure of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) studied by multilocus genotyping of single spores. *Molecular Ecology* **14**: 743-752.
- Susarla S., Medina V.F., McCutcheon S.C. 2002.** Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* **18**: 647-658.

## T

- Tafforeau L., Le Blastier S., Bamps S., Dewez M., Vandenhoute J., Hermand D. 2006.** Repression of ergosterol level during oxidative stress by fission yeast F-box protein Pof14 independently of SCF. *EMBO Journal* **25**: 4547-4556.
- Tang L., Tang X.Y., Zhu Y.G., Zheng M.H., Miao Q.L. 2005.** Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban soils in Beijing, China. *Environmental International* **31**: 822-828.
- Tavernier E., Lê Quôc D., Lê Quôc K. 1993.** Lipid composition of the vacuolar membrane of *Acer pseudoplanatus* cultured cells. *Biochimica and Biophysica Acta* **167**: 242-247.
- Testerink C., Dekker H.L., Lim Z.Y., Johns M.K., Holmes A.B., Koster C.G., Ktistakis N.T., Munnik T. 2004.** Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants. *The Plant Journal* **39**: 527-536.
- Thion C., Cébron A., Beguiristain T., Leyval C. 2012.** PAH biotransformation and sorption by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed co-cultures. *International Biodeterioration & Biodegradation* **68**: 28-35.
- Thomir A. 2007.** Impact des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur la germination des spores d'un champignon endomycorhizien: *Glomus intraradices*. Rapport de stage de Master 2 Environnement Naturel, Université du Littoral Côte d'Opale.
- Thomson B.D., Clarkson D.T., Brain P. 1990.** Kinetics of phosphorus uptake by the germ tubes of the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* **116**: 647-653.
- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge B. 1997.** Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction. *The Plant Journal* **11**: 1187-1194.
- Thorne R.F. 1992.** Classification and geography of the flowering plants. *The Botanical Review* **58**: 225-327.
- Thorpe G.W., Fong C.S., Alic N., Higgins V.J., Dawes I.W. 2004.** Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **101**: 6564-6569.
- Tisdall J.M. 1991.** Fungal hyphae and structural stability of soil. *Australian Journal of Soil Research* **29**: 729-743.
- Tisdall J.M. 1994.** Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant and Soil* **159**: 115-121.
- Tisserant B., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S., Gollote A. 1993.** In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycological Research* **97**: 245-250.
- Tisserant E. 2011.** Analyse bio-informatique du transcriptome des champignons mycorrhiziens *Tuber melanosporum* et *Glomus intraradices*. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1.
- Tisserant E., Kohler A., Dozolme-Seddas P., Balestrini R., Benabdellah K., Colard A., Croll D., Da Silva C., Gomez S.K., Koul R., Ferrol N., Fiorilli V., Formey D., Franken P. et al. 2012.** The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist* **193**: 755-769.
- Trépanier M., Bécart G., Moutoglis P., Willemot C., Gagné S., Avis T.J., Rioux J-A. 2005.** Dependence of arbuscular mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 5341-5347.
- Tuháčková J., Cajthalm T., Novák K., Novotný C., Mertelík J. 2001.** Hydrocarbon deposition and soil microflora as affected highway traffic. *Environmental Pollution* **113**: 255-262.
- Turnau K. 1998.** Heavy metal content and localization in mycorrhizal *Euphorbia cyparissias* from zinc wastes in southern Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **67**: 105-113.

## U

- Uetake Y., Kojima T., Ezawa T., Saito M. 2002.** Extensive tubular vacuole system in an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* **154**: 761-768.
- US-EPA, 1995a.** Cost and performance report: slurry phase bioremediation application at the Southeastern Wood Preserving Superfund Site Canton, Mississippi. Report contract number: 68-W3-0001.
- US-EPA, 1995b.** Cost and performance report: land treatment at the Burlington Northern Superfund Site Brainerd/Baxter, Minnesota. Report contract number: 68-W3-0001.

## V

- Van Aarle I.M., Olsson P.A. 2003.** Fungal lipid accumulation and development of mycelial structures by two arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6762-6767.
- Van Aarle I.M., Olsson P.A. 2008.** Resource partitioning between extraradical and intraradical AM fungal mycelium. Dans: Varma A. (ed) *Mycorrhiza: genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics*, 3rd edition. Springer-Verlag, Allemagne, pp. 321-336.
- Van Aarle I.M., Olsson P.A., Söderström B. 2001.** Microscopic detection of phosphatase activity of saprophytic and arbuscular mycorrhizal fungi using a fluorogenic substrate. *Mycologia* **93**: 17-24.
- Van Aarle I.M., Rouhier H., Saito M. 2002.** Phosphatase activities of arbuscular mycorrhizal intraradical and extraradical mycelium, and their relation to phosphorus availability. *Mycological Research* **106**: 1224-1229.
- Van Aarle I.M., Cavagnaro T.R., Smith S.E., Smith F.A., Dickson S. 2005.** Metabolic activity of *Glomus intraradices* in *Arum*- and *Paris*-type arbuscular mycorrhizal colonization. *New Phytologist* **166**: 611-618.
- Van Wees S.C.M., Van Der Ent S., Pieterse C.M.J. 2008.** Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 443-448.
- Vanden Bossche H. 1990.** Importance of sterols in fungal membranes. Dans: Kuhn P.J., Trinci A.P.J., Jung M.J., Goosey M.W., Copping L.G. (eds) *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*. Springer-Verlag, Germany, pp. 135-157
- Vanhaesbroeck B., Leever S.J., Ahmadi K., Timms J., Katso R., Driscoll P.C., Woscholski R., Parker P.J., Waterfield M.D. 2001.** Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annual review of Biochemistry* **70**: 535-602.
- Venedikian N., Chiochio V., Martinez A., Menendez A., Ocampo J.A., Godeas A. 1999.** Influence of the fungicides carbendazim and chlorothalonil on spore germination, arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean plants. *Agrochimica* **43**:105-109.
- Verdin A., Lounès-Hadj Sahraoui A., Durand R. 2004.** Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *International Bioremediation and Biodegradation* **53**: 65-70.
- Verdin A., Lounès-Hadj Sahraoui A., Newsam R., Robinson G., Durand R. 2005a.** Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environmental Pollution* **133**: 283-291.
- Verdin A., Lounès-Hadj Sahraoui A., Robinson G., Durand R. 2005b.** Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo[a]pyrene, on the intracellular protein composition of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **55**: 171-174.
- Verdin A., Lounès-Hadj Sahraoui A., Fontaine J., Grandmougin-Ferjani A., Durand R. 2006.** Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza* **16**: 397-405.
- Vidi P.A., Kanwischer M., Baginsky S., Austin J.R., Csucs G., Dörmann P., Kessler F., Bréhélin C. 2006.** Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *Journal of Biology and Chemistry* **281**: 11225-11234.
- Viereck N., Hansen P.E., Jakobsen I. 2004.** Phosphate pool dynamics in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* studied by in vivo <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *New Phytologist* **162**: 783-794.
- Voets L., De La Providencia I.E., Fernandez K., Ijdo M., Cranenbrouck S., Declerck S. 2009.** Extraradical mycelium network of arbuscular mycorrhizal fungi allows fast colonization of seedlings under *in vitro* conditions. *Mycorrhiza* **19**: 347-356.
- Vos C.M., Tesfahun A.N., Panis B., De Waele D., Elsen A. 2012.** Arbuscular mycorrhizal fungi induce systemic resistance in tomato against the sedentary nematode *Meloidogyne incognita* and the migratory nematode *Pratylenchus penetrans*. *Applied Soil Ecology* **61**: 1-6.

# W

- Wagner H., Horhammer L., Wolff P. 1961.** Dünnschichtchromatographie von Phosphatiden und Glykolipiden. *Biochemische Zeitschrift* **334**: 175-184.
- Walter M.H., Floß D.S., Hans J., Fester T., Strack D. 2007.** Apocarotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots: contributions from methylerythritol phosphate pathway isogenes and tools for its manipulation. *Phytochemistry* **68**: 130-138.
- Wan M.T., Rahe J.E., Watts R.G. 1998.** A new technique for determining the sublethal toxicity of pesticides to the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**: 1421-1428.
- Wang B., Yeun L.H., Xue J-Y., Liu Y., Ané J-M., Qiu Y-L. 2010.** Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytologist* **186**: 514-525.
- Wang F.Y., Lin X.G., Yin R. 2007.** Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora mellea* decreases Cu phytoextraction by maize from Cu-contaminated soil. *Pedobiologia* **51**: 99-109.
- Wang P., Wu T.H., Zhang Y. 2012.** Monitoring and visualizing of PAHs into mangrove plant by two-photon laser confocal scanning microscopy. *Marine Pollution Bulletin* **64**: 1654-1658
- Wang Z., Chen J.W., Qiao X.L. 2007.** Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons from urban to rural soils: a case study in Dalian, China. *Chemosphere* **68**: 965-971.
- Watts A.W., Ballesterio T.P., Gardner K.H. 2006.** Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in salt marsh plants *Spartina alterniflora* grown in contaminated sediments. *Chemosphere* **62**: 1253-1260.
- Weete J.D. 1989.** Structure and function of sterols in fungi. *Advances in Lipid Research* **23**: 115-167.
- Weete J.D., Furter R., Hänseler E., Rast D.M. 1985.** Cellular and chitosomal lipids of *Agaricus bisporus* and *Mucor rouxii*. *Revue Canadienne de Microbiologie* **31**: 1120-1126.
- Weete J.D., Gandhi S.R. 1996.** Biochemistry and molecular biology of fungal sterols. In: Brambl R., Marzluf G. (eds). *The mycota III biochemistry and molecular biology*. Springer, pp. 421-438.
- Weete J.D., Abril M., Blackwell M. 2010.** Phylogenetic distribution of fungal sterol. *PLoS ONE* **5**: 1-6.
- Wehner J., Antunes P.M., Powell J.R., Mazukatow J., Rillig M.C. 2010.** Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: a role for fungal diversity? *Pedologia* **53**: 197-201.
- Wei S., Pan S. 2010.** Phytoremediation for soils contaminated by phenanthrene and pyrene with multiple plant species. *Journal of Soil Sediments* **10**: 886-894.
- Weiersbye I.M., Straker C.J., Przybylowicz W.J. 1999.** Micro-PIXE mapping of elemental distribution in arbuscular mycorrhizal roots of the grass, *Cynodon dactylon*, from gold and uranium mine tailings. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **158**: 335-343.
- Weissenhorn I., Leyval C. 1995.** Root colonization of maize by a Cd-sensitive and a Cd-tolerant *Glomus mosseae* and cadmium uptake in sand culture. *Plant and Soil* **175**: 233-238.
- Weissenhorn I., Leyval C., Berthelin J. 1993.** Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted soils. *Plant and Soil* **157**: 247-256.
- Weissenhorn I., Glashoff A., Leyval C., Berthelin J. 1994.** Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. *Plant and Soil* **167**: 189-196.
- Wentzinger L.F., Bach T.J., Hartmann M.A. 2002.** Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase. *Plant Physiology* **130**: 334-346
- Wenzel W.W., Adriano D.C., Salt D.E., Smith R.D. 1999.** Phytoremediation: a plant-microbe-based remediation system. Dans: *Bioremediation of contaminated soils*.
- Whipps J.M. 2004.** Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany* **82**: 1198-1227.
- White K.L. 1986.** An overview of immunotoxicology and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Carcinology Reviews* **2**: 163-202.
- Wild S.R., Jones K.C. 1995.** Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environmental Pollution* **88**: 91-108.
- Wild S.R., McGrath S.P., Jones K.C. 1990.** The Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAH) content of archived sewage sludge. *Chemosphere* **20**: 703-716.
- Wild S.R., Berrow M.L., Jones K.C. 1991a.** The Persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge amended agricultural soils. *Environmental Pollution* **72**: 141-157.
- Wild S.R., Obbard J.P., Munn C.I., Berrow M.L., Jones K.C. 1991b.** The long-term persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in an agricultural soil amended with metal-contaminated sewage sludges. *Science of the Total Environment* **101**: 235-253.
- Wilson S.C., Jones K.C. 1993.** Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environmental Pollution* **81**: 229-249.
- Wislocki P.G., Wood A.W., Chang R.L., Levin W., Yagi H., Hernandez O., Jerina D.M., Conney A.H. 1976.** High mutagenicity and toxicity of a diol epoxide derived from benzo[a]pyrene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **68**: 1006-1012.

- Wood A.W., Wislocki P.G., Chang R.L., Levin W., Lu A.Y.H., Yagi H., Hernandez O., Jerina D.M., Conney A.H. 1976.** Mutagenicity and cytotoxicity of benzo[a]pyrene benzo-ring epoxides. *Cancer Research* **36**: 3358-3366.
- Wright D.P., Read D.J., Scholes J.D. 1998.** Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment* **21**: 881-891.
- Wright S.F., Upadhyaya A. 1998.** A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **198**: 97-107.
- Wu F.Y., Yu X.Z., Wu S.C., Lin X.G., Wong M.H. 2011.** Phenanthrene and pyrene uptake by arbuscular mycorrhizal maize and their dissipation in soil. *Journal of Hazardous Materials* **187**: 341-347.
- Wu N., Huang H., Zhang S., Zhu Y-G., Christie P., Zhang Y. 2009.** Phenanthrene uptake by *Medicago sativa* L., under the influence of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Environmental Pollution* **157**: 1613-1618.
- Wu Q.S., Zou Y.N. 2008.** Mycorrhiza has a direct effect on reactive oxygen metabolism of drought-stressed citrus. *Plant, Soil and Environment* **55**: 436-442.
- Wu Q.S., Zou Y.N., Xia R.X., Wang M.Y. 2007.** Five *Glomus* species affect water relations of *Citrus tangerine* during drought stress. *Botanical Studies* **48**: 147-154.
- Wu Q.S., Xia R.X., Zou Y.N. 2008.** Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *European Journal of Soil Biology* **44**: 122-128.
- Wu Y.R., He T.T., Lun J.S., Maskaoui K., Huang T.W., Hu Z. 2009.** Removal of benzo[a]pyrene by a fungus *Aspergillus* sp. BAP14. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**: 1395-1401.
- Wunder T., Marr J., Kremer S., Sterner O., Anke K. 1997.** 1-Methoxypyrene and 1,6-dimethoxypyrene: two novel metabolites in fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Archives of Microbiology* **167**: 310-316.

## Y

- Yano K., Yoshida S., Müller J., Singh S., Banba M., Vickers K., Markmann K., White C., Schuller B., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Murooka Y., Perry J., Wang T.L., Kawaguchi M., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Parniske M. 2008.** CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **105**: 20540-20545.
- Yao M.K., Desilets H., Charles M.T., Boulanger R., Tweddell R.J. 2003.** Effect of mycorrhization on the accumulation of rishitin and solavetivone in potato plantlets challenged with *Rhizoctonia solani*. *Mycorrhiza* **13**: 333-336.
- Yokoi S., Quintero F.J., Cubero B., Ruiz M.T., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Pardo J.M. 2002.** Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal* **30**: 529-539.
- Yoshida S., Parniske M. 2005.** Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine phosphorylation. *Journal of Biology and Chemistry* **280**: 9203-9209.
- Yu X.Z., Wu S.C., Wu F.Y., Wong M.H. 2011.** Enhanced dissipation of PAHs from soil using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. *Journal of Hazardous Materials* **186**: 1206-1217.

## Z

- Zhan X., Ma H., Zhou L., Liang J., Xu G. 2010.** Accumulation of phenanthrene by roots of intact wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings: passive or active uptake? *BMC Plant Biology* **10**: 52
- Zhan X., Zhang X., Yin X., Ma H., Liang J., Zhou L., Jiang T., Xu G. 2012.** H<sup>+</sup>/phenanthrene symporter and aquaglyceroporin are implicated in phenanthrene uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Journal of Environmental Quality* **41**: 188-196.
- Zhang Q., Blaylock L.A., Harrison M.J. 2010.** Two *Medicago truncatula* half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Cell* **22**: 1483-1497.
- Zhang X-H., Zhu Y-G., Lin A-J., Chen B-D., Smith S.E., Smith F.A. 2006.** Arbuscular mycorrhizal fungi can alleviate the adverse effects of chlorothalonil on *Oryza sativa* L. *Chemosphere* **64**: 1627-1632.
- Zhong Q.H., Chao X.H., Zhi B.Z., Zhi R.Z., Huai S.W. 2007.** Changes in antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscular mycorrhizae under NaCl stress. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* **59**: 128-133.
- Zhu H.H., Yao Q. 2004.** Localized and systemic increase of phenols in tomato roots induced by *Glomus versiforme* inhibit *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Phytopathology* **152**: 537-542.
- Zocco D., Fontaine J., Lozanova E., Renard L., Bivort C., Durand R., Grandmougin-Ferjani A., Declerck S. 2008.** Influence of two sterol biosynthesis inhibitor fungicides (fenpropimorph and fenhexamid) on the development of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycological Research* **112**: 592-601.
- Zocco D., Van Aarle I.M., Oger E., Lanfranco L., Declerck S. 2011.** Fenpropimorph and fenhexamid impact phosphorus translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **21**: 363-374.

**Zuccarini P., Okurowska P. 2008.** Effects of mycorrhizal colonization and fertilization on growth and photosynthesis of sweet basil under salt stress. *Journal of Plant Nutrition* **31**: 497-513.

**Zweytick D., Athenstaedt K., Daum G. 2000.** Intracellular lipid particles of eucaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1469**: 101-120.

<http://www.dictionnaire-environnement.com/>

<http://minedunord.fr>

# Annexe

---

## Valorisation



Publications dans des journaux scientifiques à comité de lecture (de rang A):

- **CALONNE M., Lounès-Hadj Sahraoui A., Campagnac E., Debiane D., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Fontaine J.** (2012) Propiconazole inhibits the sterol 14 $\alpha$ -demethylase in *Glomus irregulare* like in phytopathogenic fungi. *Chemosphere* 87: 376-383. Impact Factor (IF): 3,206.
- **Debiane D., CALONNE M., Fontaine J., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (2012) Benzo[a]pyrene induced lipid changes in the monoxenic arbuscular mycorrhizal chicory roots. *Journal of Hazardous Materials* 209-210: 18-26. IF: 4,173.
- **Debiane D., CALONNE M., Fontaine J., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (2011) Lipid content disturbance in the arbuscular mycorrhizal, *Glomus irregulare* grown in monoxenic conditions under PAHs pollution. *Fungal Biology* 115: 782-792. IF: 2,921.
- **Labidi S., CALONNE M., Ben Jeddi F., Debiane D., Rezgui S., Laruelle F., Tisserant T., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (2011) Calcareous impact on arbuscular mycorrhizal fungus development and on lipid peroxidation in monoxenic roots. *Phytochemistry* 72: 2335-2341. IF: 3,351.

Chapitre d'ouvrage:

- **CALONNE M., Fontaine J., Debiane D., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (2010) Propiconazole toxicity on the non-target organism, the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus irregulare*. *Fungicides*, Odile Carisse (Ed.), ISBN: 978-953-307-266-1, InTech, Chapter 16, pp 325-346.  
Disponible sur: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/propiconazole-toxicity-on-the-non-target-organism-the-arbuscular-mycorrhizal-fungus-glomus-sp->

Actes de congrès:

- **CALONNE M., Tisserant B., Dupré de Boulois H., Fontaine J., Courcot D., Declerck S., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (2012) Les HAPs issus des retombées atmosphériques altèrent le transport du phosphore par les champignons mycorrhiziens vers les plantes. 7<sup>ème</sup> Journées Interdisciplinaires de la Qualité de l'Air.
- **CALONNE M., Fontaine J., Debiane D., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (2011) Side effects of the sterol biosynthesis inhibitor (SBI) fungicide, propiconazole, on a beneficial arbuscular mycorrhizal fungus. *Proceeding of the 63<sup>rd</sup> International Symposium on Crop Protection*. In: *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, Ghent University 76: 891-902
- **Debiane D., CALONNE M., Fontaine J., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (2010) Lipid analysis of the environmental pollutant impact, PAH, on the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp. *Proceeding of Consoil 11<sup>th</sup>*.



Communications orales:

- **CALONNE M., Fontaine J., Tisserant B., Dupré de Boulois H., Laruelle F., Declerck S., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (6 septembre 2012) Les HAPS inhibent le développement des CMA: mécanismes biochimiques et moléculaires affectés?. 3<sup>èmes</sup> Journées Francophones des Mycorhizes 2012 (JFM3), Nancy, France.
- **CALONNE M., Tisserant B., Dupré de Boulois H., Fontaine J., Courcot D., Declerck S., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (2 février 2012) Les HAPS issues des retombées atmosphériques altèrent le transport du phosphore par les champignons mycorrhiziens vers les plantes. 7<sup>ème</sup> Journées Interdisciplinaires de la Qualité de l'Air, Villeneuve d'Ascq, France.
- **CALONNE M., Fontaine J., Debiante D., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (26 mai 2011) Etude de la toxicité d'un fongicide, le propiconazole, sur un organisme non-cible: le champignon mycorrhizien arbusculaire *Glomus irregulare*. Séminaire doctorant UCEIV, Calais, France.
- **CALONNE M., Fontaine J., Debiante D., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (24 mai 2011) Side effects of the sterol biosynthesis inhibitor (SBI) fungicide, propiconazole, on a beneficial arbuscular mycorrhizal fungus. 63<sup>rd</sup> International Symposium on Crop Protection, Gand, Belgique.
- **Lounès-Hadj Sahraoui A., Debiante D., CALONNE M., Fontaine A., Grandmougin-Ferjani A., Garçon G., Verdin A., Shirali P.** (30 novembre 2010) Les mycorhizes: agents de réhabilitation durable des sols contaminés par les HAP? Journée "Environnement et Santé", Lille, France.
- **Debiante D., CALONNE M., Fontaine J., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (15-17 septembre 2010) Les mycorhizes à arbuscules : une stratégie de réhabilitation verte et durable des sols pollués par les HAP? 2<sup>ème</sup> Journées Francophones des Mycorhizes 2010 (JFM2), Bruxelles, Belgique.
- **Fontaine J., Campagnac E., CALONNE M., Debiante D., Lounès-Hadj Sahraoui A., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A.** (26-28 mai 2010) Impact des fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols sur un champignon mycorrhizien arbusculaire, *Glomus intraradices*: utilisation d'un modèle *in vitro*. 40<sup>ème</sup> congrès du Groupe Français des Pesticides, Banyuls sur Mer, France.
- **Grandmougin-Ferjani A., Campagnac E., CALONNE M., Debiante D., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A., Laruelle F., Oger E., Lanfranco L.** (25-29 janvier 2010) Singularité du métabolisme des stérols chez *Glomus intraradices*, champignon arbusculaire mycorrhizien (MA), effets des fongicides Inhibiteurs de la Biosynthèse des Stérols (IBS). 8<sup>èmes</sup> rencontres de Phytopathologie/Mycologie de la Société Française de Mycologie, Aussois, France.

Posters:

- **CALONNE M., Fontaine J., Debiane D., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (8 juillet 2011) Rôle de la symbiose mycorhizienne arbusculaire dans la tolérance des plantes aux aérocontaminants d'origine industrielle (HAPs) et dans leur dissipation. Journée IRENI, Douai, France.
  
- **CALONNE M., Debiane D., Fontaine J., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (5 novembre 2010) Etude *in vitro* de l'impact d'un mélange d'HAPs sur le développement d'un champignon mycorhizien à arbuscules. Journée IRENI, Dunkerque, France.
  
- **Debiane D., CALONNE M., Fontaine J., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (5 novembre 2010) Les HAPs affectent le métabolisme lipidique de la symbiose mycorhizienne à arbuscules. Journée IRENI, Dunkerque, France.
  
- **Debiane D., Fontaine J., CALONNE M., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (22-25 septembre 2010) Lipid analysis of the environmental pollutant impact, PAH, on the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp. ConSoil 11<sup>th</sup> International FZK/TNO Conference on Soil-Water Systems, Salzbourg, Autriche.
  
- **CALONNE M., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A., Debiane D., Campagnac E., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A.** (15-17 septembre 2010) Impact d'un fongicide, le propiconazole, sur le développement et le métabolisme stérolique du champignon mycorhizien arbusculaire *Glomus* sp. 2<sup>ème</sup> Journées Francophones des Mycorhizes 2010 (JFM2), Bruxelles, Belgique.
  
- **Debiane D., Fontaine J., CALONNE M., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A.** (25-29 janvier 2010) Analyse lipidique des effets de polluants environnementaux, les HAP, sur la symbiose mycorhizienne en condition monoxénique. 8<sup>ème</sup> rencontres de Phytopathologie/Mycologie de la Société Française de Mycologie, Aussois, France.





## **Impact des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur le métabolisme lipidique et le transport du phosphore chez le champignon mycorhizien à arbuscules *Rhizophagus irregularis***

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), d'origine principalement anthropique, figurent parmi les polluants organiques persistants majeurs détectés dans les sols pollués. Ils présentent une toxicité avérée vis-à-vis de l'Homme (cancérogènes et/ou mutagènes) et peuvent perturber le bon fonctionnement des écosystèmes. Parmi les méthodes de remédiation des sols pollués par les HAPs, la phytoremédiation assistée par les champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA), pourrait représenter une alternative innovante en adéquation avec le développement durable, respectueuse de l'Homme et de son environnement. L'utilisation des mycorhizes comme agents de bio-dépollution présente plusieurs avantages dont une meilleure tolérance à la toxicité des polluants, une meilleure nutrition hydrique et minérale ainsi qu'une meilleure dissipation des polluants. Cependant l'efficacité de cette phytotechnologie repose sur la résistance des deux partenaires de la symbiose à la toxicité des polluants. Quelques études ont décrit l'impact des HAPs sur le développement des CMA en lien avec une peroxydation lipidique et une perturbation des teneurs en lipides totaux. Cependant, ni les cibles d'action de ces polluants au niveau du métabolisme lipidique du CMA, ni le rôle de ces modifications dans sa tolérance aux HAPs et dans leur dissipation n'ont été étudiés. C'est pourquoi, le premier objectif de ce travail visait à mieux comprendre l'impact des HAPs sur le métabolisme lipidique. Grâce à des expériences de radiomarquage par l'acétate [ $1-^{14}\text{C}$ ], précurseur des lipides, nos résultats ont montré une perturbation des voies de biosynthèse des lipides membranaires (phospholipides et stérols) dans le mycélium extra-racinaire de *Rhizophagus irregularis* cultivé *in vitro*. D'autre part, nos résultats ont montré que les HAPs affectaient l'un des bénéfices majeurs de la symbiose mycorhizienne: la nutrition phosphatée, en particulier, l'étape de transfert du phosphore du mycélium intra-racinaire à la racine. Par ailleurs, la capacité des racines et du CMA à dégrader et à bioaccumuler le benzo[a]pyrène, HAP lourd, a été mise en évidence. Enfin, l'implication du métabolisme des lipides de réserve (les triacylglycérols) du mycélium extra-racinaire dans la régénération des membranes altérées, la lutte contre le stress oxydant induit par les HAPs et dans leur métabolisation/bioaccumulation est discutée.

**Mots clés:** hydrocarbures aromatiques polycycliques, champignon mycorhizien arbusculaire, phytoremédiation, métabolisme lipidique, nutrition phosphatée, benzo[a]pyrène dégradation, cultures *in vitro*, *Rhizophagus irregularis*, écotoxicité

---

## **Polycyclic aromatic hydrocarbon impact on lipid metabolism and phosphorus transport in the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis***

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) originating mainly from anthropogenic activities, are frequently found in the polluted soils. These major persistent organic pollutants are harmful for human health (carcinogenic and/or mutagenic) and can disrupt the ecosystem functioning. To clean-up the PAHs polluted soils, phytoremediation assisted by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) could represent an innovative alternative in line with sustainable development, cost-effective and environmentally friendly. The use of mycorrhizas, as biological remediation tool, has several advantages including increased tolerance to the pollutant toxicity, improved water and mineral nutrition as well as a better pollutant dissipation. However, the effectiveness of this phytotechnology is based on the both symbiosis partners tolerance to the pollutant toxicity. Only few studies have described the impact of PAHs on the AMF development related with lipid peroxidation and total lipid content disturbance. However, so far neither the target action of these pollutants on the AMF lipid metabolism, nor the role of these lipid changes in PAH tolerance and in their dissipation have been studied. Therefore, the present work aims firstly to improve our understanding of the PAHs impact on the CMA lipid metabolism. Thanks to radiolabeling experiments with [ $1-^{14}\text{C}$ ]acetate as lipid precursor, our results showed a disruption of the membrane lipid (phospholipids and sterols) biosynthesis pathways in *Rhizophagus irregularis* extraradical mycelium, grown in the presence of PAHs in *in vitro* cultures. Secondly, it was highlighted that PAHs affected one of the major benefits provided by the mycorrhizal symbiosis: the phosphate nutrition, in particular, phosphorus transfer from the intraradical mycelium to the root. Finally, the roots as well as the CMA abilities to degrade and to bioaccumulate the benzo[a]pyrene, a high molecular weight PAH, were pointed out. To conclude, the involvement of extraradical mycelium storage lipid (triacylglycerols) metabolism in the membrane regeneration, the fight against the PAH induced-oxidative stress and the PAH metabolism/bioaccumulation is discussed.

**Keywords:** polycyclic aromatic hydrocarbons, arbuscular mycorrhizal fungus, phytoremediation, lipid metabolism, phosphate nutrition, benzo[a]pyrene degradation, *in vitro* cultures, *Rhizophagus irregularis*, ecotoxicity