



**HAL**  
open science

# Diversité et caractérisation fonctionnelle des communautés microbiennes inféodées au peuplier et issues d'une friche industrielle enrichie en mercure

Alexis Durand

► **To cite this version:**

Alexis Durand. Diversité et caractérisation fonctionnelle des communautés microbiennes inféodées au peuplier et issues d'une friche industrielle enrichie en mercure. Ecosystèmes. Université Bourgogne Franche-Comté, 2017. Français. NNT : 2017UBFCD037 . tel-01824587

**HAL Id: tel-01824587**

**<https://theses.hal.science/tel-01824587>**

Submitted on 27 Jun 2018

**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.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE  
ÉCOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT SANTE  
LABORATOIRE CHRONO-ENVIRONNEMENT -- UMR 6249 CNRS

## THÈSE

OBTENTION DU GRADE DE  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE  
SPECIALITE « SCIENCES DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT »

# DIVERSITE ET CARACTERISATION FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES INFEODEES AU PEUPLIER ET ISSUES D'UNE FRICHE INDUSTRIELLE ENRICHIE EN MERCURE

*Par Alexis Durand*

Soutenance publique à Montbéliard le 11 décembre 2017

### Membres du jury :

Claudia COSIO (Professeure, URCA – SEBIO)	Rapporteur
Pascale BAUDA (Professeure, UL – LIEC)	Rapporteur
Mélanie ROUHIER (Professeure, UL – IAM)	Présidente
Stéphane VUILLEUMIER (Professeur, UNISTRA – GMGM)	Examineur
Michel CHALOT (Professeur, UFC – LCE)	Directeur de thèse
Christophe GUYEUX (Professeur, UFC – FEMTO-ST)	Codirecteur de thèse
David CAZAUX (Responsable Service Environnement, INOVYN)	Invité
Damien BLAUDEZ (Maître de conférences, UL – LIEC)	Invité



# Remerciements

---

Toutes les thèses se doivent d'avoir une partie « Remerciements », paraît-il, et il est vrai que la liste des personnes à remercier est longue tant la science est un monde où la collaboration est un facteur primordial de réussite. J'espère n'oublier personne au cours de cet exercice périlleux qui peut détruire des amitiés et briser des carrières. Il est temps de remercier tout le monde, sincèrement, même si ça ressemble à des adieux et que je n'y prends pas beaucoup de plaisir. De toute façon je suis certain que je croiserai à nouveau beaucoup d'entre vous... Je me soumets donc au rite du remerciement.

Pour commencer soyons créatif. Je tiens à remercier les organisations qui ont permis le financement de cette thèse : *l'Université de Bourgogne-Franche-Comté* et *le Conseil Régional de Bourgogne-Franche-Comté*. Merci également à *Daniel Gilbert*, et à *Gudrun Bornette* pour m'avoir accueilli au sein du *laboratoire Chrono-Environnement*.

Je voudrais aussi remercier les membres de mon jury de thèse : les Professeures *Claudia Cosio* et *Pascale Bauda*, pour le temps qu'elles ont consacré à la lecture, à l'analyse détaillée de mon travail, ainsi que les Professeur(e)s *Mélanie Rouhier* et *Stéphane Vuilleumier*, pour avoir également accepté de juger mon travail de thèse. Merci à *David Cazaux* et à INOVYN pour leur accueil et leur disponibilité sur le site industriel de Tavaux. Un merci particulier à *Damien Blaudez* et au LIEC pour nos échanges scientifiques tout au long de ma thèse. Merci Damien, sans toi je n'aurais probablement jamais entendu parler de ce sujet de thèse, qui est devenu ma thèse.

Je remercie tous mes collaborateurs, ceux qui ont contribué à mener à bien mes travaux de recherche jusqu'à leurs publications et qui aboutissent à ce petit manuscrit. Je voudrais avoir un petit mot pour chacune et chacun d'entre vous.

Je souhaite commencer par remercier mes encadrants de thèse : *Christophe Guilleux* et *Michel Chalot*. Michel, merci d'avoir été mon directeur de thèse. Brillant, simple et efficace, tu m'as beaucoup appris et je t'en suis redevable. Tu m'as laissé beaucoup d'amplitude et d'autonomie dans ma recherche et tu m'as toujours été de bons conseils. J'aurais d'ailleurs sans doute dû t'écouter davantage, mais il paraît que je suis têtue. Grâce à toi, je pense être un meilleur

chercheur aujourd'hui, merci. J'aurais aussi voulu te dire que tu as fait de moi un dictionnaire vivant, un Bescherelle sur pattes, mais pour ça, c'est un échec. Tu n'es d'ailleurs pas le premier à avoir subi mon orthographe et je dois remercier *Émile Benizri* qui pendant mon Master deuxième année m'a donné goût à la science, pour le meilleur et pour le pire. Merci Monsieur Benizri, je dirais même, merci Émile.

Si je suis meilleur chercheur, c'est aussi grâce à tous ceux qui m'ont formé pendant mes trois années de thèse et qui contribuent à la qualité générale de ce travail. Merci à *Benoît Valot* pour sa patience infinie lors de nos très, très, très, très nombreux échanges qui m'ont guidé dans le monde merveilleux de la bio-informatique. Benoît, à cause de toi, je sais désormais utiliser Mothur sur le bout des doigts (cd ~ Mothur/Merci\_Benoit). Je remercie également mon collègue *Hyun Soon Gweon* de Wallingford (UK) qui m'a aidé à maîtriser les fonctionnalités du logiciel de traitement bio-informatique PIPITS et qui prouve que la science et les idées sont sans frontières. Thank you dear Mr. Gweon.

Je veux remercier *Julie Foulon* pour les innombrables conseils qu'elle m'a distillés sur la vie de tous les jours dans le laboratoire, pour m'avoir beaucoup appris sur la culture de champignons et m'avoir coaché en biologie moléculaire. Merci aussi pour ton humour si... particulier. Merci à *Cyril Zappelini*, mon compagnon de formations diverses et variées, et merci pour sa contribution au bon fonctionnement de notre petit laboratoire. Je remercie aussi *Mohamad Assad* pour ses nombreuses suggestions, sa gentillesse et sa disponibilité à toute épreuve. Je tiens à remercier *Vanessa Alvarez-Lopez*, pour ses précieux conseils et son savoir-faire en microbiologie, Muchas gracias. Je remercie *Coralie Bertheau* pour la formation qu'elle m'a apportée sur BioEdit et Mega. Coralie, la spécialiste des statistiques (mais si), merci pour tes cours qui me sont encore très utiles aujourd'hui. Merci à *Lisa Ciadamidaro* pour son aide sur le terrain, et merci à *Mimì* pour sa compagnie, grazie mille. Merci à *Philippe Binet* qui brille par sa disponibilité et son humour, vive la Bretagne !

Je tiens aussi à remercier ma fine équipe de stagiaires qui m'a été d'une aide inestimable pendant ma thèse. *Samantha Villermain*, *Marie Goncalves*, *Sarah Guinchard*, merci de m'avoir aidé à relever le défi d'une thèse en trois ans. Je souhaite aussi remercier les autres stagiaires que j'ai côtoyés, merci à *Chloé Viotti* pour son aide en grammaire, en orthographe et pour son aide précieuse en général et merci à *Bastien Bourillon* pour son soutien en statistiques. J'ai également eu le plaisir de donner des cours à l'UFC, ce qui m'a également beaucoup formé et

participe de ma capacité à encadrer la recherche. Je souhaite remercier les collègues qui m'ont aidé à préparer mes cours : *Geneviève Chiapusio* à l'énergie sans limite et *Leila Qasemian* la joueuse de fléchette.

Bien sûr, merci à mes « potos du labo » : *Guillaume Foursov*, *Loïc Yung* et *François Maillard*. Guillaume, le guitariste (il fait de la basse en vrai), merci pour ta bonne humeur au labo et en dehors. Loïc, François, merci pour nos réunions free-style fléchettes qui ont pour sûr fait avancer la science, merci d'avoir été là pour aller sur le terrain (dédicace à *Jean-Didier* où que tu sois) et merci pour tout en fait. Loïc, merci de m'avoir accueilli chez toi à Réchésy pour pratiquer le beau jeu sur le terrain de foot et merci de m'avoir fait rencontrer *Épona* en vrai. François, merci pour tous nos échanges scientifiques et pour ta bonne humeur, travailler avec toi était une aventure de tous les jours.... Si les petits cochons ne te mangent pas je suis sûr que tu feras un grand chercheur.

Merci à tous, vous avez été, à l'origine de la qualité et du savoir-faire du laboratoire de Montbéliard durant ces trois dernières années, un lieu où le travail se fait dans la bonne humeur et dans l'excellence (proche de chez vous). Ce fut un plaisir de me compter parmi vous.

Merci à tous mes amis ! Merci aux BIORANGERS mes amis du Master BIOMANE. Vous voir est à chaque fois un vrai plaisir et merci d'avoir été là quand j'en avais besoin malgré la distance. A bientôt.

Et enfin, et surtout, merci à ma famille qui m'a toujours soutenu, même sans le savoir, juste parce qu'elle est là pour moi. Je suis à court d'humour ici : Maman, Papa, Maxime...  
Merci.



# Table des matières

---

<b>1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>- 3 -</b>
1.1 LA CONTAMINATION DES SOLS PAR LES ETMS	- 3 -
1.1.1 Généralités	- 3 -
1.1.2 Définition des Éléments Traces Métalliques	- 5 -
1.1.3 Origines naturelles et anthropiques des ETMs	- 7 -
1.1.4 Toxicité des ETMs	- 9 -
1.1.4.1 La biodisponibilité et spéciation dans les sols	- 9 -
1.1.4.2 Effets toxiques des ETMs à l'échelle de la cellule et pour l'Homme	- 11 -
1.1.4.3 Les réglementations	- 13 -
1.1.5 Réhabilitation des sites et sols pollués	- 15 -
1.1.5.1 Généralités	- 15 -
1.1.5.2 Les techniques biologiques de remédiation des sols	- 16 -
1.1.5.3 Le phytomanagement	- 18 -
1.2 LES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES ASSOCIÉES AUX PLANTES	- 22 -
1.2.1 L'écosystème rhizosphérique	- 22 -
1.2.1.1 L'habitat rhizosphérique	- 22 -
1.2.1.2 Les microorganismes de la rhizosphère	- 23 -
1.2.2 L'écosystème phyllosphérique	- 30 -
1.2.2.1 L'habitat phyllosphérique	- 30 -
1.2.2.2 Les microorganismes de la phyllosphère	- 33 -
1.2.3 L'influence des microorganismes sur la plante-hôte	- 40 -
1.2.3.1 Antagonismes vis-à-vis des agents pathogènes (action PGP indirecte)	- 41 -
1.2.3.2 L'induction de résistance systémique (action PGP indirecte)	- 42 -
1.2.3.3 Diminution du stress éthylène (action PGP indirecte)	- 43 -
1.2.3.4 La production d'hormones (action PGP directe)	- 44 -
1.2.3.5 L'amélioration de la nutrition (action PGP directe)	- 46 -
1.3 TECHNIQUES D'ANALYSES DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES	- 48 -
1.3.1 La génomique environnementale : le métabarcoding	- 48 -
1.3.2 Evolution du séquençage, trois générations de méthodes	- 49 -
1.3.3 Les trois principales technologies de séquençage de seconde génération et l'Ion Torrent	- 52 -
1.3.4 Le métabarcoding et les communautés de microorganismes	- 55 -
1.4 INTERACTIONS BETWEEN Hg AND MICROBES: A REVIEW ON MICROBIAL DIVERSITY AND MECHANISMS, WITH AN EMPHASIS ON FUNGAL PROCESSES	- 59 -
1.4.1 Introduction	- 60 -
1.4.1.1 History of Hg in the industrial and environmental contexts	- 60 -
1.4.1.2 Fate of Hg released from natural and anthropogenic sources	- 61 -
1.4.2 Assessing the impact of Hg on the soil fungal communities	- 63 -
1.4.2.1 Traditional methods	- 63 -
1.4.2.2 Molecular methods	- 67 -
1.4.3 Impact of Hg on the soil bacterial communities	- 70 -
1.4.3.1 Traditional methods	- 70 -
1.4.3.2 Molecular methods	- 72 -
1.4.4 Fungal mechanisms related to Hg exposure	- 73 -
1.4.4.1 Lessons learnt from bacteria	- 74 -
1.4.4.2 Fungi as terrestrial Hg hyperaccumulators ?	- 76 -
1.4.4.3 Hg tolerance mechanisms in fungi	- 79 -
1.4.5 Conclusions	- 83 -
<b>2. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE</b>	<b>- 88 -</b>
<b>3. SITE D'ÉTUDE, MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>- 94 -</b>
3.1 SITE D'ÉTUDE	- 94 -
3.1.1 Présentation de la friche industrielle de Tavaux	- 94 -
3.1.2 Caractéristique physico-chimique du substrat de la lagune	- 96 -
3.2 MATÉRIELS BIOLOGIQUES	- 97 -
3.2.1 Peuplier ( <i>Populus trichocarpa</i> x <i>Populus maximowiczii</i> / cv Skado)	- 97 -
3.2.2 Poivrons	- 98 -



3.2.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	- 99 -
3.2.4	<i>Podospora anserina</i> .....	- 100 -
3.3	METHODES.....	- 100 -
3.3.1	<i>Communautés microbiennes : génomique environnementale</i> .....	- 100 -
3.3.1.1	Prélèvement des échantillons .....	- 100 -
3.3.1.2	Extraction de l'ADN environnemental .....	- 101 -
3.3.1.3	L'amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR).....	- 102 -
3.3.1.4	Choix des amorces et séquençage Sanger .....	- 103 -
3.3.1.5	Séquençage très haut débit Illumina MiSeq .....	- 106 -
3.3.1.6	Traitement bio-informatique des séquences : « Pipeline » .....	- 107 -
3.3.1.7	Analyses post-traitement informatique .....	- 109 -
3.3.2	<i>Communautés microbiennes : approche culture-dépendante</i> .....	- 110 -
3.3.2.1	Prélèvement des échantillons .....	- 110 -
3.3.2.2	Isolement de microorganismes résistants au Hg.....	- 111 -
3.3.2.3	Caractérisation génétique des microorganismes résistants au Hg.....	- 112 -
3.3.2.4	Caractérisation phénotypique des microorganismes .....	- 114 -
3.3.2.5	Préparation de l'inoculum et pré-culture des poivrons.....	- 117 -
3.3.2.6	Expérience en conditions contrôlées.....	- 118 -
3.3.2.7	Analyses sur le poivron.....	- 119 -
3.3.3	<i>Accumulation du Hg dans des champignons modèles</i> .....	- 120 -
3.3.3.1	Tolérance au Hg chez <i>S. cerevisiae</i> en présence de divers cations.....	- 120 -
3.3.3.2	Mutations de gènes de transport transmembranaire et effet sur l'accumulation du Hg chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	- 121 -
3.3.3.3	Détermination de la CMI et de la capacité d'accumulation du Hg par les souches sauvage PaWT, mutant Pa GeneX <sup>A</sup> et recombinant [Pa GeneX <sup>A</sup> Pa GeneX <sup>*</sup> ] de <i>P. anserina</i> .....	- 122 -
3.3.3.4	Effet d'inhibiteurs métaboliques sur l'accumulation du Hg par <i>P. anserina</i> .....	- 123 -
3.3.3.5	Détermination de la compartimentation cellulaire du Hg chez <i>P. anserina</i> .....	- 123 -
3.3.3.6	Mesure de la fixation du Hg aux thiols chez <i>P. anserina</i> .....	- 124 -
3.3.4	<i>Méthodes générales</i> .....	- 125 -
3.3.4.1	Analyses statistiques .....	- 125 -
3.3.4.2	Dosage du Hg.....	- 126 -
4.	<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	- 130 -
4.1	PREAMBULE.....	- 130 -
4.2	L'ADN ENVIRONNEMENTAL, LE BON INTERMEDIAIRE POUR DECRIRE LES COMMUNAUTES DE MICROORGANISMES DANS LEUR HABITAT ET POUR DECELER LES EFFETS DU Hg A L'ECHELLE DE LA COMMUNAUTE ? .....	- 134 -
4.2.1	<i>Contexte et publication</i> .....	- 134 -
4.2.2	<i>Bilan et mise en perspective des travaux</i> .....	- 166 -
4.2.3	<i>Contraintes du metabarcoding en génomique environnementale</i> .....	- 166 -
4.2.4	<i>La perspective du « shotgun metagenomic sequencing»</i> .....	- 168 -
4.3	L'APPROCHE CULTURE DEPENDANTE PERMET L'ISOLEMENT DE PGPB RESISTANTES AU Hg ISSUES D'UNE PEUPLERAIE SE DEVELOPPANT SUR UN SOL ENRICHI EN Hg .....	- 174 -
4.3.1	<i>Contexte et publication</i> .....	- 174 -
4.3.2	<i>Bilan et mise en perspective des travaux</i> .....	- 207 -
4.3.3	<i>Contrainte des expériences d'inoculation de PGPB</i> .....	- 209 -
4.3.4	<i>Le poivron : un bioindicateur de la contamination du Hg atmosphérique</i> .....	- 213 -
4.4	LE TRANSPORTEUR DE ION GENE X EST IMPLIQUE DANS L'ACCUMULATION DU Hg CHEZ LES CHAMPIGNONS : ÉTUDE SUR LES MODELES PODOSPORA ANSERINA ET SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	- 218 -
4.4.1	<i>Contexte et publication</i> .....	- 218 -
4.4.2	<i>Bilan et mise en perspective des travaux</i> .....	- 242 -
4.4.3	<i>La transcriptomique : application pour notre étude</i> .....	- 243 -
4.5	CONCLUSION GENERALE .....	- 248 -

# Liste des illustrations

## Figures :

- FIGURE 1 :** LES SERVICES ECOSYSTEMIQUES POUVANT ETRE RENDUS PAR LES SOLS (DOMINATI *ET AL.*, 2010). .....- 3 -
- FIGURE 2 :** TENEURS TOTALES EN PLOMB DANS LES SOLS DE FRANCE MESUREES SUR LA PERIODE 2000-2009, DE 0 A 30 CM DE PROFONDEUR. COMMISSARIAT GENERAL AU DEVELOPPEMENT DURABLE MIS A JOUR LE 13/10/2014. ....- 5 -
- FIGURE 3 :** LES CONTAMINANTS AFFECTANT LE SOL ET LES EAUX SOUTERRAINES EN EUROPE (AEE 2017). ....- 6 -
- FIGURE 4 :** DEFINITION DE LA TEXTURE D'UN SOL EN PEDOLOGIE (DRIDI & ZEMMOURI, 2012). ....- 7 -
- FIGURE 5 :** LES CLASSES DE TOXICITES DES ETMS DANS LA CELLULE SELON LEMIRE, HARRISON ET TURNER 2013. ....- 12 -
- FIGURE 6 :** STRATEGIES DES PLANTES EN REPONSE A L'AUGMENTATION DE LA CONCENTRATION EN NICKEL DANS LE SOL (BAKER, 1981).  
.....- 16 -
- FIGURE 7 :** OUTILS D'AIDE A LA DECISION POUR L'ETABLISSEMENT D'UN PROJET DE PHYTOMANAGEMENT SELON ANDERSSON-SKÖLD *ET AL.* (2014). ....- 18 -
- FIGURE 8 :** DES EXEMPLES D'ESPECES VEGETALES UTILES EN PHYTOMANAGEMENT SELON PANDEY, BAJPAI ET SINGH (2016). .....- 19 -
- FIGURE 9 :** LES INTERACTIONS AU SEIN DE LA RHIZOSPHERE IMPLIQUANT LA PLANTE ET LES MICROORGANISMES (PIETERSE *ET AL.*, 2016). ....- 24 -
- FIGURE 10 :** SCHEMA ILLUSTRANT LES SYMBIOSES ECTOMYCORHIZIENNE ET ENDOMYCORHIZIENNE (DR. TOHID NOORALVANDI, 2016).  
.....- 28 -
- FIGURE 11 :** DSE DANS LES RACINES DU RIZ SAUVAGE (MONTRE EN COUPE LONGITUDINALE, ECHELLE = 20 MM) : (A) COLONISATION D'HYPHES COLOREES AU BLEU DE TRYPAN DANS LES CELLULES EPIDERMiques AVEC CERTAINES STRUCTURES DE TYPE CHLAMYDOSPORE; (B) COOCURRENCE D'HYPHES MELANISEES ET DEVELOPPEMENT DE STRUCTURES SCLEROTISTIQUES DANS OU SUR LA COUCHE DE CORTEX RACINAIRE; (C) LA COLONISATION D'HYPHES MELANISEES DANS L'EPIDERME ET LE CORTEX ET LES HYPHES QUI POUSSENT LE LONG DE L'EPIDERME OU DU CORTEX PARALLELEMENT A L'AXE LONGITUDINAL DES RACINES; (D) D'AUTRES CHAMPIGNONS ENDOPHYTIQUES COLORES AU BLEU DE TRYPAN, COLONISATION INTRACELLULAIRE DANS LE CORTEX RACINAIRE; (E) COOCURRENCE D'HYPHES MELANISEES ET D'AUTRES CHAMPIGNONS ENDOPHYTIQUES COLORES AU BLEU; (F) INITIATION, DEVELOPPEMENT ET FORMATION DE MICROSCLEROTES. (YUAN *ET AL.*, 2010). ....- 29 -
- FIGURE 12 :** L'HABITAT PHYLLOSPHERIQUE : LE PHYLLOPLAN (VORHOLT, 2012). ....- 30 -
- FIGURE 13 :** LES HABITATS DE L'ECOSYSTEME FORESTIER (BALDRIAN, 2017), ICI, SONT ENTOURES LES HABITATS PHYLLOSPHERIQUES. . - 31 -
- FIGURE 14 :** COURBES DE RAREFACTIONS EN FONCTION DE LA SAISON MONTRANT LE NOMBRE D'ESPECES BACTERIENNES IDENTIFIEES PAR SEQUENÇAGE 16S (799F-1492R) SUR DES ECHANTILLONS DE PHYLLOPLAN (*POPULUS DELTOIDES*) EN FONCTION DU NOMBRE DE SEQUENCES OBSERVEES (REDFORD & FIERER, 2009). ....- 33 -
- FIGURE 15 :** INTERACTIONS ENTRE MICROORGANISMES ET LE PHYLLOPLAN (A GAUCHE) ET MICROSCOPIE PAR FLUORESCENCE DU PHYLLOPLAN REVELANT PAR LES FLECHES BLEUES DES BACTERIES AUX JONCTIONS CELLULAIRES, PAR LA FLECHE BLANCHE LA BASE D'UN TRICHOME GLANDULAIRE, PAR LA FLECHE ORANGE UNE HYPHE FUNGIQUE ET PAR LA FLECHE VERTE UN AGGLOMERAT DE BACTERIES A LA BASE DU TRICHOME (LINDOW & BRANDL, 2003). ....- 33 -
- FIGURE 16 :** (A GAUCHE) REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TECHNIQUE IVET. LA TECHNIQUE IMPLIQUE UNE SOUCHE MUTE POUR UN GENE ESSENTIEL POUR LA CROISSANCE (EGF) ET UN SECOND ELEMENT A SAVOIR LE "PROMOTER TRAP". C'EST UN PLASMIDE AVEC UNE CASSETTE EGF SANS PROMOTEUR (PVI) ET UN GENE RAPPORTEUR (REP). L'ADN BACTERIEN EST CLONE ALEATOIREMENT DANS LE "PROMOTER TRAP" (ETAPE 1) PUIS INTEGRE DANS LE CHROMOSOME DE LA SOUCHE MUTANTE EGF (ETAPE 2). SEUL L'ADN ENVIRONNEMENTALE QUI PORTE LE PROMOTEUR INDUISANT EGF VA COMPENSER LA MUTATION ET PERMETTRE LA CROISSANCE DE LA BACTERIE (ETAPE 3). LA SUSPENSION BACTERIENNE EST ALORS ETALEE SUR UN MILIEU GELOSE DE CULTURE IN VITRO QUI PERMET DE REVELER LE GENE RAPPORTEUR CE QUI PERMET DE DISTINGUER LES BACTERIES PORTEUSES D'UN PROMOTEUR INDUIT DANS L'ENVIRONNEMENT DES PROMOTEURS "CONSTITUTIF" (ETAPE4). UNE SECONDE IVET PERMET D'EVITER LES FAUX POSITIFS. (A DROITE) DIAGRAMME DE LA FITNESS RELATIVE DE *P. FLUORESCENS* SBW25 MUTE SUR L'OPERON WSS EN FONCTION DE L'HABITAT. L'ERREUR STANDARD EST REPRESENTEE. (GAL *ET AL.*, 2003; REDIERS *ET AL.*, 2005). ....- 34 -
- FIGURE 17 :** (A.) « NON-METRIC MULTIDIMENSIONAL SCALING » (NMDS) PRESENTANT LA VARIATION DES COMMUNAUTES BACTERIENNES PHYLLOSPHERIQUES ASSOCIEES A *ABIES BALSAMEA* (ABBA), *ACER RUBRUM* (ACRU), *ACER SACCHARUM* (ACSA), *BETULA PAPIRIFERA* (BEPa) ET *PICEA GLAUCA* (PIGL) DETECTEES PAR SEQUENÇAGE ILLUMINA DE LA REGION 16S BACTERIENNE (799F-1115R). NOTONS QUE DEUX TEMPS ONT ETE PRIS EN COMPTE (JUILLET ET AOUT) ET TROIS SITES DE FORETS TEMPEREES. LES ELIPSES REPRESENTENT LES INTERVALLES DE CONFIANCE POUR CHAQUE ESPECE. (B.)

« PERMUTATIONAL ANALYSIS OF VARIANCE » (PERMANOVA) PRESENTANT LES FACTEURS EXPLICATIFS DE LA VARIATION DE LA STRUCTURE DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE(LAFOREST-LAPOINTE <i>ET AL.</i> , 2016). .....	36 -
<b>FIGURE 18</b> : LES INTERACTIONS DE LA PLANTE ET DES MICROORGANISMES DANS LA PHYLLOSHERE (VORHOLT, 2012). .....	37 -
<b>FIGURE 19</b> : LES QUATRE GRANDES CLASSES DE PGPB SELON GLICK (2014). .....	38 -
<b>FIGURE 20</b> : LES HYPOTHESES LORS DE L'EMISSION DE VOCs PAR LA PLANTE AU NIVEAU DU PHYLLOPLAN : .....	40 -
<b>FIGURE 21</b> : LES MECANISMES DE PROMOTION DE LA CROISSANCE DES PLANTES PAR LES MICROORGANISMES.....	40 -
<b>FIGURE 22</b> : STRUCTURES ET CONSTANTES D'AFFINITES AVEC LE FER(III) - $K_{Fe(III)}$ - DE SIDEROPHORES MICROBIENS (AHMED, 2014). -	41 -
<b>FIGURE 23</b> : ASSOCIATION PLANTE - PGPR, MODELE MENANT A LA DIMINUTION DE LA PRODUCTION D'ETHYLENE A-KB : A- KETOBUTYRATE, ACC : 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE, AdoMet : S-ADENOSYL-METHIONINE IAA : L'ACIDE INDOLE-3-ACETIQUE, PGPR : PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA (GLICK <i>ET AL.</i> , 1997). .....	43 -
<b>FIGURE 24</b> : EFFETS DE L'INOCULATION DE <i>PSEUDOMONAS LIBANENSIS</i> TR1 (TR1) ET DE <i>PSEUDOMONAS REACTANS</i> PH3R3 (PH3R3) OU SANS INOCULATION (BLANK) SUR LA MASSE SECHE DE <i>BRASSICA OXYRRHINA</i> EN FONCTION DE QUATRE TRAITEMENTS : i) OPTIMAL DE CROISSANCE SOIT UN ARROSAGE FIXE A 100 % DE LA CAPACITE DE RETENTION EN EAU DU SOL ET NON ENRICHIS EN ZN ET CU (CONTROL), ii) 50 % DE LA CAPACITE DE RETENTION EN EAU DU SOL ET NON ENRICHIS EN ZN ET CU (DROUGHT), iii) 100 % DE LA CAPACITE DE RETENTION EN EAU DU SOL ET UN SOL ENRICHIS EN CU (400 MG.KG <sup>-1</sup> ) ET EN ZN (500 MG.KG <sup>-1</sup> ) (METAL), ET IV) ii + iii (DROUGHT + METAL) (MA <i>ET AL.</i> , 2016).....	45 -
<b>FIGURE 25</b> : INTERACTION DES SIDEROPHORES BACTERIENS AVEC LES METAUX PRESENTS DANS LES SOLS (RAJKUMAR <i>ET AL.</i> , 2010) ; SPB : SIDEROPHORE PRODUCING BACTERIA. ....	47 -
<b>FIGURE 26</b> : LES REGIONS AMPLIFIEES DANS LE CADRE DE LA GENOMIQUE ENVIRONNEMENTALE, ON PARLE DE MARQUEURS GENETIQUES. (AU DESSUS) REGION 16S POUR LES PROCARYOTES (BACTERIES) ; (EN DESSOUS) REGION ITS POUR LES EUCARYOTES (CHAMPIGNONS). ....	48 -
<b>FIGURE 27</b> : UTILISATION DU SEQUENÇAGE HAUT DEBIT DES MARQUEURS GENETIQUES 16S ET 18S POUR APPREHENDER LES MICROORGANISMES DANS L'ENVIRONNEMENT (ICI LA PHYLLOSHERE) SELON BRINGEL ET COUEE (2015). ....	49 -
<b>FIGURE 28</b> : CHRONOLOGIE DE LA COMMERCIALISATION DES SEQUENCEURS HAUT DEBIT SELON AHAKOUD (2015) .....	50 -
<b>FIGURE 29</b> : PROJETS DE SEQUENÇAGE PAR DOMAINE EN 2012 (A GAUCHE) ET PAR SUJET D'ETUDE PAR AN (A DROITE) SELON LE JGI. -	51 -
<b>FIGURE 30</b> : A) STRUCTURES UTILISEES POUR LE SEQUENÇAGE D'UNE MOLECULE D'ADN UNIQUE, B) COURANT RESIDUEL MESURE A TRAVERS LE NANOPORE PERMETTANT DE DISCRIMINER CHAQUE NUCLEOTIDE. SELON AHAKOUD (2015).....	52 -
<b>FIGURE 31</b> : PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE DE PYROSEQUENÇAGE ROCHE 454 (DAMETTO, 2011).....	53 -
<b>FIGURE 32</b> : PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE DE SEQUENÇAGE ILLUMINA (LU <i>ET AL.</i> , 2015). ....	53 -
<b>FIGURE 33</b> : PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE DE SEQUENÇAGE SOLID (DAMETTO, 2011).....	54 -
<b>FIGURE 34</b> : NOMBRE DE PUBLICATIONS RECENSEES VIA GOOGLE SCHOLAR FAISANT REFERENCE AUX TECHNOLOGIES DE L'ION TORRENT PGM, DU PYROSEQUENÇAGE ROCHE 454 ET D'ILLUMINA MiSEQ EN FONCTION DE LA PERIODE DE PUBLICATION PAR TRANCHE DE 5 ANNEES DEPUIS 1982 JUSQU'A 2016.....	56 -
<b>FIGURE 35</b> : L'ABONDANCE RELATIVE DES FAMILLES BACTERIENNES DANS LES 18 CONDITIONS : TROIS SOLS (0-15 CM DE PROFONDEUR): S1 (ZONE RESIDENTIELLE), S2(ZONE RESIDENTIELLE) ET S3(ZONE FORESTIERE) QUI ONT ETE ENRICHIS EN HgCl <sub>2</sub> POUR ATTEINDRE DES CONCENTRATIONS DE 0, 5, 10, 50, 150 ET 200 MG.KG <sup>-1</sup> DE SOL SEC (MAHBUB <i>ET AL.</i> , 2016b). ...	59 -
<b>FIGURE 36</b> : THE MOST RECENT Hg RESERVOIRS AND GLOBAL ATMOSPHERE Hg INVENTORY ILLUSTRATING THE EXCHANGE FLUXES BETWEEN ATMOSPHERE AND EARTH SURFACES (ZHU <i>ET AL.</i> , 2016).....	62 -
<b>FIGURE 37</b> : CYCLING OF Hg THROUGH THE ARCTIC MARINE AND TERRESTRIAL ECOSYSTEMS (STERN <i>ET AL.</i> , 2012). ....	63 -
<b>FIGURE 38</b> : EFFECTS OF Hg CONCENTRATIONS IN THE SOIL FOR: A) ROOT COLONIZATION BY ECM; B) MORPHOTYPE RICHNESS OF ECM; C) ECM DIVERSITY (SHANNON INDICE); E) HEIGHT OF <i>PINUS RIGIDA</i> SHOOT (CM); F) STEM DIAMETER OF <i>PINUS RIGIDA</i> (MM); G) SHOOT WEIGHT OF <i>PINUS RIGIDA</i> (G) (CRANE <i>ET AL.</i> , 2012).....	66 -
<b>FIGURE 39</b> : ARISA SHOWING MAGNITUDE OF THE BACTERIAL GENETIC STRUCTURE MODIFICATIONS DURING 80 DAYS AFTER (A) HEAT STRESS AND (B) MERCURY POLLUTION FOR THE THREE LEVELS OF DIVERSITY; D0 (BLACK FULL LINE), D3 (GREY DOTTED LINE) AND D5 (LIGHT GREY DASHED LINE). MAGNITUDE WAS DETERMINED BY CALCULATING THE EUCLIDEAN DISTANCE BETWEEN DISTURBED AND CONTROL MICROCOSMS FOR EACH INCUBATION TIME. NOTATION INDICATES A SIGNIFICANTLY DIFFERENT RESPONSE (KRUSKA-WALLIS TEST; P < 0.05) IN TERMS OF GENETIC STRUCTURE CHANGE BETWEEN THE THREE LEVELS OF DIVERSITY (TARDY <i>ET AL.</i> , 2014). ....	68 -
<b>FIGURE 40</b> : TAXONOMIC TREE OF THE Hg INDICATOR OTUs (I.E. OTUs SIGNIFICANTLY CORRELATED WITH THE 32 µg Hg.g <sup>-1</sup> DRY SOIL TREATMENT, DEFINED AS P < 0.05, CORRELATION COEFFICIENT ≤ -0.3 OR ≥ 0.3 AND ABUNDANCE >10 SEQUENCES) OF THE FUNGAL COMMUNITIES OF THE DIFFERENT SOILS. THE DIFFERENT COLORED TREE BRANCHES REPRESENT THE DIFFERENT PHYLA, AND THE NUMBERS INDICATE ABUNDANCE CLASSES. A HEATMAP SURROUNDING THE TREE REPRESENTS THE ASSOCIATION STRENGTH OF THE OTUs: RED POSITIVE ASSOCIATION (INDICATING TOLERANT OTUs), GREEN NEGATIVE ASSOCIATION (INDICATING SENSITIVE OTUs), BLACK NO VALUE (OTUs NOT PRESENT OR NOT AN INDICATOR OTU) FOR EACH SOIL. THE BAR PLOT SURROUNDING THE HEATMAP REPRESENTS THE OTUs ABUNDANCE (I.E. NUMBER OF SEQUENCES) (FROSSARD <i>ET AL.</i> , 2017).....	70 -

<b>FIGURE 41</b> : SCHEMATIC REPRESENTATION OF THE BACTERIAL COMMUNITY RESPONSE TO SUCCESSIVE MINOR PERTURBATIONS AND SEVERE STRESSES (BRESSAN <i>ET AL.</i> , 2008).....	- 72 -
<b>FIGURE 42</b> : NUMBER OF PUBLICATIONS REFERENCED IN GOOGLE SCHOLAR SINCE 2000 ON Hg FOR BACTERIA OR FUNGI.....	- 74 -
<b>FIGURE 43</b> : COMPARISON BETWEEN MAXIMUM Hg CONCENTRATION AND MAXIMUM Hg BIOCONCENTRATION FACTOR (BCF) OF MACROFUNGI REPORTED IN THE LITERATURE. SMALLEST VALUES ARE REPRESENTED IN DETAILS ON THE RIGHT. REFERENCES: (LAAKSOVIRTA & LODENIUS, 1979; MINAGAWA <i>ET AL.</i> , 1980; KOJO & LODENIUS, 1989; SVOBODA <i>ET AL.</i> , 2000; DEMIRBAS, 2001; FALANDYSZ & BIELAWSKI, 2001; FALANDYSZ <i>ET AL.</i> , 2001, 2002; COCCHI <i>ET AL.</i> , 2006; CHUDZYŃSKI <i>ET AL.</i> , 2009; MELGAR <i>ET AL.</i> , 2009; NASR & ARP, 2011, 2016; JARZYŃSKA & FALANDYSZ, 2012; GIANNACCINI <i>ET AL.</i> , 2012; RIEDER & FREY, 2013; FALANDYSZ & BOROVIČKA, 2013; DRYŻAŁOWSKA & FALANDYSZ, 2014; FALANDYSZ, 2014; WIEJAK <i>ET AL.</i> , 2014; HUANG <i>ET AL.</i> , 2015; SABA <i>ET AL.</i> , 2016).....	- 76 -
<b>FIGURE 44</b> : SYNTHESIS OF THG POOL SIZES AND RELATED INPUT/OUTPUT RATES FOR FOREST BIOMASS, FOREST FLOOR AND MINERAL SOIL PERTAINING THE CASE-STUDY BASED BENCHMARK EVALUATION FOR TEMPERATE FORESTS ON TILL-DERIVED SOIL PARENT MATERIALS (NASR AND ARP 2016).....	- 78 -
<b>FIGURE 45</b> : ORGANISATION DES MISSIONS DE FREDI-Hg (D'APRES FRANÇOIS MAILLARD). .....	- 88 -
<b>FIGURE 46</b> : CALENDRIER DE THESE. ....	- 90 -
<b>FIGURE 47</b> : PROCESSUS D'ELECTROLYSE A Hg SELON INRIS .....	- 95 -
<b>FIGURE 48</b> : LA LAGUNE DE DEPOTS DES SEDIMENTS DE L'ETANG DE L'AILLON DANS LA COMMUNE DE SAINT SYMPHORIEN-SUR-SAONE (LATITUDE 47°4'52" NORD, LONGITUDE : 5° 20'14" EST) EN 2012 (A GAUCHE) ET 2016 (A DROITE).....	- 96 -
<b>FIGURE 49</b> : A) PLAN DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL ; B) APERÇU DU PEUPLIER DE LA VARIETE SKADO SUR LE DISPOSITIF EXPERIMENTAL EN JUIN 2017 ; C) COMPARAISON DU PEUPLIER I214 ET DU SKADO SUR LE DISPOSITIF EXPERIMENTAL EN JUIN 2017.....	- 97 -
<b>FIGURE 50</b> : LE POIVRON <i>CAPSICUM ANNUUM</i> DU CULTIVAR YOLO WONDER : PARTIE AERIENNE (A GAUCHE), FEUILLES ET FLEURS (AU CENTRE) ET PARTIE RACINAIRE (A DROITE). .....	- 98 -
<b>FIGURE 51</b> : GEL D'AGAROSE SUR LEQUEL ONT MIGRE DES EXTRAITS D'ADN TOTAL DE CHAQUE HABITAT VISUALISE. LES BANDES NOIRES SONT DES AMAS D'ADN REVELES GRACE AU BET ET AU UV.....	- 102 -
<b>FIGURE 52</b> : LA STRUCTURE DE L'ADN PAR SES DECOUVREURS (WATSON & CRICK, 1953) (A GAUCHE) ; VUE D'ARTISTE D'UN DOUBLE BRIN D'ADN EN HELICE ALPHA (A DROITE). ....	- 103 -
<b>FIGURE 53</b> : PRINCIPE POUR L'AMPLIFICATION DES MARQUEURS GENETIQUES BACTERIENS ET FONGIQUES. ....	- 104 -
<b>FIGURE 54</b> : MIGRATION SUR GEL D'ELECTROPHORESE DES PCR SUR LES TRANSFORMANTS PORTANT L'ADN 16S (EN HAUT) ET 18S (EN BAS) SUR LEUR PLASMIDE. LES BANDES NOIRES SONT DES AMAS D'ADN REVELES GRACE AU BET ET AUX UV IMPLIQUANT LA BONNE INTEGRATION DES MARQUEURS GENETIQUES DANS <i>E. COLI</i> . ....	- 105 -
<b>FIGURE 55</b> : PRINCIPE DE LA POLYMERISATION SPECIFIQUE DU SEQUENÇAGE SANGER . ....	- 106 -
<b>FIGURE 56</b> : PIPITS, LE PIPELINE AUTOMATISE POUR L'ANALYSE DE SEQUENCES FUNGIQUES ITS OBTENU PAR SEQUENÇAGE « ILLUMINA » (GWEON <i>ET AL.</i> , 2015). ....	- 107 -
<b>FIGURE 57</b> : LE DISPOSITIF EXPERIMENTAL A TAVAux FIN MAI 2015 LORS DE LA PREMIERE CAMPAGNE D'ISOLEMENT.....	- 111 -
<b>FIGURE 58</b> : LES POIVRONS A T0 (A GAUCHE), A T46 (AU CENTRE) ET A T68 DANS LE PHYTOTRON AVEC L'ATMOSPHERE ENRICHIE EN Hg (A DROITE). ....	- 118 -
<b>FIGURE 59</b> : DISPOSITIF DE POMPAGE A TRAVERS DES FILTRES A CHARBON ACTIF POUR LA DETECTION DU Hg ATMOSPHERIQUE. .-	- 119 -
<b>FIGURE 60</b> : <i>PODOSPORA ANSERINA</i> SOUCHE SAUVAGE MAT+ EN BOITE DE PETRI CONTENANT LE MILIEU M2 GELOSE.....	- 122 -
<b>FIGURE 61</b> : ANALYSEUR DE MERCURE AVANCE (AMA) 254.....	- 126 -
<b>FIGURE 62</b> : LES STRATEGIES CLASSIQUES EN METAGENOMIQUE ANALYTIQUE (SHARPTON, 2014). ....	- 169 -
<b>FIGURE 63</b> : CAS DE LA DEFORESTATION AMAZONIENNE. PROPORTION DES GROUPES BACTERIENS ASSOCIES AVEC : (A) LE METABOLISME DE L'ADN, (B) LE METABOLISME DE L'ARN, (C) LE METABOLISME DES PROTEINES, (D) LE METABOLISME DE L'N, (E) LE METABOLISME DU P, (F) LE METABOLISME DU K, (G) LE METABOLISME DU S, (H) LE METABOLISME ET L'ACQUISITION DU Fe, (I) LE METABOLISME DES COMPOSES AROMATIQUES, ET (J) LE METABOLISME SECONDAIRE ; ESTIMES DANS LES SOLS FORESTIERS ET APRES DEFORESTATION. LES CERCLES REPRESENTENT L'ABONDANCE RELATIVE DU PHYLUM BACTERIEN EN COMPARANT LE NOMBRE DE SEQUENCES APPARTENANT AU PHYLUM AU NOMBRE TOTAL DE SEQUENCES BACTERIENNES CLASSEES DANS LA CATEGORIE FONCTIONNELLE (NAVARETE <i>ET AL.</i> , 2015) .....	- 170 -
<b>FIGURE 64</b> : IMAGES OBTENUES PAR MICROSCOPE A BALAYAGE LASER TIREES DES TRAVAUX DE OLIVEIRA ET AL. (2009), (E) : DETECTION PAR FISH DE <i>GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS</i> ET <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</i> APRES 72 H D'INOCULATION SUR L'EPIDERME RACINAIRE EN UTILISANT TROIS SONDAS (ALF-1B-FLUOS, HRUBRI-445-CY5, ET HERSO-445-CY3), (F) : DETECTION FISH DE <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</i> APRES 24 H D'INOCULATION SUR L'EPIDERME RACINAIRE EN UTILISANT LES TROIS SONDAS EUB-338-I, II, III-FLUOS, ADIA- CY3 ET HERB-CY5. ....	- 211 -
<b>FIGURE 65</b> : IMAGES OBTENUES PAR MICROSCOPIE A FLUORESCENCE SOUS LUMIERE UV ISSUES DES TRAVAUX DE SUN ET AL. (2014), DETECTION DE <i>PSEUDOMONAS</i> SP. PH6-GFP APRES INOCULATION DANS LES RACINES, (D) DANS LES TIGES (E) ET DANS LES FEUILLES (F) ; (A), (B) ET (C) SERVENT DE CONTROLE NON INOCULE. ....	- 212 -
<b>FIGURE 66</b> : TURBIDITE CELLULAIRE ET FLUORESCENCE MOYENNE DE LA GFP DANS LE CADRE D'UNE CULTURE EN MILIEU LB AGITE DE <i>ERWINIA HERBICOLA</i> Eh299RH JBA28 (PCPP39). AU- DESSUS, LES IMAGES ONT ETE OBTENUES PAR MICROSCOPIE A	

FLUORESCENCE SOUS LUMIERE UV A T = 0, 1, 2 ET 3 H DE GAUCHE A DROITE MONTRANT LA BACTERIE (PCPP39) MARQUEE PAR GFP (REMUS-EMSERMANN & LEVEAU, 2010).	- 212 -
<b>FIGURE 67</b> : ACCUMULATION DE HG DANS <i>CAPSICUM ANNUUM</i> (POIVRON CULTIVAR YOLO WONDER) APRES 46 JOURS D'EXPOSITION AU HG DANS LES CONDITIONS DE CULTURE PRESENTEES DANS LE MANUSCRIT DU CHAPITRE 2 (GUINCHARD, 2017).	- 214 -
<b>FIGURE 68</b> : ACCUMULATION DU HG DANS LES FEUILLES DE POIVRON SUR LE SITE INDUSTRIEL AU BOUT D'UN MOIS D'EXPOSITION. LES ZONES 3 ET 4 SONT LES PLUS PROCHES DE LA SOURCE DE CONTAMINATION, LES TEMOINS SONT DES POIVRONS NON EXPOSES A L'ATMOSPHERE DU SITE, PRELEVES A T0. LA DEVIATION STANDARD EST REPRESENTEE, DES LETTRES DIFFERENTES REPRESENTENT DES DIFFERENCES SIGNIFICATIVES, P < 0,01)	- 214 -
<b>FIGURE 69</b> : DIAGRAMME ONTOLOGIQUE AUTOUR DES TERMES « MERCURY ION TRANSPORT » CHEZ <i>S. CEREVISIAE</i> . LES NOMBRES ENTRE PARENTHESES CORRESPONDENT A LA QUANTITE DE REFERENCES SCIENTIFIQUES CHEZ <i>S. CEREVISIAE</i> LIEES AUX TERMES MENTIONNES AU NIVEAU DES DISQUES.	- 218 -
<b>FIGURE 70</b> : LE RESEAU DE REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION ZAP1P AINSI QUE L'EXPRESSION DE SES GENES CIBLES INDIQUENT UNE DEREGULATION DE L'HOMEOSTASIE DES METAUX LORS D'UN TRAITEMENT ANTIFONGIQUE (SYNERGIE DE L'AMPHOTERICINE B ET DE LA LACTOFERRINE). LA BASE DE DONNEES YEASTRACT A ETE UTILISEE POUR IDENTIFIER LES GENES CIBLES DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION ZAP1P DANS CES CONDITIONS. LA FIGURE PRESENTE L'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DE ZAP1P ET DE SES GENES CIBLES SOUS TRAITEMENT ANTIFONGIQUE, 16 DES 32 GENES CIBLES SOUS EXPRIMES (EN VERT). DANS LE RESEAU, CHAQUE CERCLE REPRESENTE UN GENE AVEC SON IDENTIFIANT. LA BARRE INDIQUE LE CHANGEMENT D'EXPRESSION (LOG2) DANS LE RESEAU, SOUS EXPRESSION EN VERT, SUREXPRESSION EN ROUGE ET PAS DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE EN BLANC. LES CADRES BLEUS INDIQUENT DES INTERACTIONS PROTEINES-PROTEINES. LES FLECHES NOIRES MONTRENT LES REGULATIONS TRANSCRIPTIONNELLES, AVEC LA FLECHE POINTANT SUR LE GENE CIBLE.	- 244 -

## Tableaux :

<b>TABLEAU 1</b> : CARACTERISTIQUES GENERALES DES PRINCIPAUX ETMS DES SOLS D'APRES ROLLIN AND QUIOT 2006.	- 10 -
<b>TABLEAU 2</b> : VALEURS LIMITES POUR DES EAUX DESTINEES A LA CONSOMMATION HUMAINE (ARRETE DU 11 JANVIER 2007).	- 13 -
<b>TABLEAU 3</b> : VALEURS LIMITES DE CONCENTRATION EN ETMS DANS LES SOLS PH 6-7 (ARRETE DU 2 FEVRIER 1998).	- 14 -
<b>TABLEAU 4</b> : VALEURS LIMITES DE CONCENTRATION EN ETMS DANS LES BOUES DESTINEES A LEUR VALORISATION EN AGRICULTURE.	- 14 -
<b>TABLEAU 5</b> : VALEURS LIMITES POUR LES QUANTITES ANNUELLES D'ETMS POUVANT ETRE INTRODUITES DANS LES SOLS CULTIVES SUR LA BASE D'UNE MOYENNE DE DIX ANS.	- 14 -
<b>TABLEAU 6</b> : CLASSEMENT DES PRINCIPAUX ETMS PARMIS LES CONTAMINANTS PRIORITAIRES AUX USA EN 2015 (ATSDR).	- 15 -
<b>TABLEAU 7</b> : TERMINOLOGIE DANS LE DOMAINE DE LA PHYTOREMEDIATION TIREE DE LA LITTERATURE SCIENTIFIQUE.	- 17 -
<b>TABLEAU 8</b> : TYPES DE RHIZODEPOTS PRODUITS PAR LES VEGETAUX (DAKORA & PHILLIPS, 2002).	- 22 -
<b>TABLEAU 9</b> : COMPETENCES BACTERIENNES CONNUES ET REQUISES DANS LA RHIZOSPHERE, LE RHIZOPLAN ET/OU L'ENDOSPHERE PAR LES PGPB (COMPANT ET AL., 2009).	- 26 -
<b>TABLEAU 10</b> : LES GROUPES TAXONOMIQUES (PHYLLA) AU SEIN DES CHAMPIGNONS (GAVERIAUX, 2012).	- 27 -
<b>TABLEAU 11</b> : CONCENTRATION EN ETMS DANS LES RACINES ET LES PARTIES AERIENNES DE <i>PINUS SYLVESTRIS</i> CULTIVE SUR UN SOL CONTAMINE EN Pb PAR UNE ACTIVITE MINIERE AVEC ET SANS L'INOCULATION DE <i>TRICHODERMA</i> PDR1-7 (BABU ET AL., 2014).	- 30 -
<b>TABLEAU 12</b> : MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATIONS (MIC) OF 21 FUNGAL STRAINS ON HG-ENRICHED SYNTHETIC GROWTH MEDIA (SANGLIMSUWAN ET AL., 1993).	- 64 -
<b>TABLEAU 13</b> : RISK LEVELS OF CORRELATIONS BETWEEN SH- AND METAL CONTENTS OF FUNGI. A= WHOLE MATERIAL, L= FRUITING BODIES GROWING ON LAWNS, F= FRUITING BODIES GROWING IN FORESTS. 0: P < 0.1, 1: P < 0.05, 2 P < 0.01, 3: P < 0.001 (CALCULATED AS IF THE VALUES WERE NORMALLY DISTRIBUTED). TSH: TOTAL -SH, NPSH: FREE -SH, PSH: PROTEIN BOUND -SH (KOJO & LODENIUS, 1989).	- 80 -
<b>TABLEAU 14</b> : PEDOLOGIE DU SOL DE LA PARCELLE EXPERIMENTALE (RAPPORT D'ANALYSE SADEF).	- 96 -
<b>TABLEAU 15</b> : LES SOUCHES DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> BY4741 UTILISEES LORS DE LA THESE.	- 99 -
<b>TABLEAU 16</b> : NOMBRE DE SEQUENCES ASSIGNEES AU RANG TAXONOMIQUE DE L'ESPECE (DURAND ET AL. 2017, SOUMIS). LES NOMBRES ENTRE PARENTHESES CORRESPONDENT AUX POURCENTAGES DE « SEQUENCES EFFECTIVES TOTALES NORMALISEES » ASSIGNEES A L'ESPECE. LES FEUILLES COMPORTENT 22 ECHANTILLONS, LES TIGES 21, LES RACINES 23 ECHANTILLONS ET LE SOL 24.	- 209 -

# Liste des abréviations

<b>Abréviation</b>	<b>Désignation complète</b>
ADEME	Agence De l'Environnement Et de la Maîtrise de l'Énergie
ADN(e)	Acide DésoxyriboNucléique (environnementale)
AEE	Agence Européenne de l'Environnement
AIA	Acide Indole-3-Acétique
AMA	Advanced Mercury Analyser
AMF	Arbuscular Micorrhizal Fungi
ANR	Agence National pour la Recherche
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BASIAS	BASE de données sur l'historique des sites Industriels et Activités en Service
BASOL	BASE de données sur les sites et SOLs pollués ou potentiellement pollués appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif.
BRGM	Bureau de Recherches Géologiques et Minières
BSA	Bovine Serum Albumin
CAS	Chrome Azurole S
CMI	Concentration Minimal Inhibitrice
CP et CR	Consortium Phyllosphérique et Consortium Rhizosphérique
CTAB	Cetyl TrimethylAmmonium Bromide
DO	Densité Optique
DSE	Dark Septate endophyte
DTT	DiThioThréitol
EC2CO	ECosphere COntinentale et COtière
EDTA	Ethylène Diamine TétraAcétique
EPS	ExoPolySaccharide
ETM	Élement Trace Métallique
ERO	Éspèce Réactive de l'Oxygène
FISH	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
FPGN	Fond Pédo-Géochimique Naturel
GFP	Green Fluorescent Protein
GOLD	Genome OnLine Database
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HCC	Hexamine (III) Cobalt Chloride
HTS	High Throughput DNA Sequencing
INERIS	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
ISR/S	Induced Systemic Resistance/Suppression
ITS	Internal Transcribed Spacer
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JGI	Joint Genome Institute
LB	Luria-Bertani
LCE	Laboratoire Chrono-Environnement
MM	Milieu Minimum
MTES	Ministère de la Transition Écologique et Solidaire
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NFb	N-Free semisolid malate medium
NMDS	Non-metric MultiDimensional Scaling
OTU	Operational Taxonomic Unit
pb ou bp	paire de base ou « base pair »
PBS	Phosphat Buffer Salin
PCR	Polymerase Chain Reaction
(PERM)ANOVA	(Permutational) ANalysis Of VAriance
PGPR et PGPB	Plant Growth Promoting (Rhizo) Bacteria
PIA	Programme d'Investissements d'Avenir
PMSF	PhenylMethylSulfonyl Fluor
PPi	PyroPhosphate inorganique
PTP	PicoTiter Plate
PVC	PolyChlorure de Vinyle
PVP	Poly Vinyl Pyrrolidone
PVPP	PolyVinyl-PolyPyrrolidone
rpm	Rotation par minute
RS	reproductive success
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SMS	Single Molecule Sequencing
TAH	Teneur Agricole Habituel
TBE	Tris, Borate, EDTA
TCA	TrichloroAcétique Acid
TNT	TriNitroToluène
UE	Union Européenne
UFC	Unités Formant Colonie
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
USA	United States of America
UV	UltraViolets
VOC	Volatil Organic Compound
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose

# Chapitre 1

---

adn (34) atmosphere (21) **bacteria** (44) **bacterial** (32) **bacteries** (46)  
cd (26) **champignons** (29) **communaute** (29) **communautes** (30)  
communities (26) **community** (27) **concentration** (47) concentrations (24)  
conditions (20) contaminants (21) contamination (24) **croissance** (36) cu (25)  
elements (22) environment (22) **etms** (76) **exposure** (35) **fungal** (61)  
**fungi** (83) **habitat** (22) **hg** (363) **hgcl** (21) mechanisms (20) **mehg** (34)  
metaux (23) **microorganismes** (106)  
organismes (28) **pb** (24) **phyllosphere** (47) **plante** (76)  
**plantes** (87) **production** (46) **racines** (33) **resistance** (23)  
rhizosphere (33) **role** (20) **sequencage** (43) **sites** (31) **soil** (100)  
**sol** (97) **sols** (55) **stress** (25) **structure** (23) **technologie** (21) **zn** (22)

*Analyse sémantique du chapitre 1*





# 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette partie est une synthèse des connaissances provenant de la sphère scientifique nécessaires pour aborder le sujet de thèse.

## 1.1 La contamination des sols par les ETMs

### 1.1.1 Généralités

Le sol résulte de la transformation des couches superficielles de la roche mère de notre bien nommée Terre, seule planète, à notre connaissance, qui dispose de cette fine couche de terre, indispensable pour la Vie telle que nous la connaissons. Sur ce sol les minéraux issus de l'altération des roches mères sous-jacentes permettent l'apparition de plantes pionnières. Celles-ci, moins exigeantes que d'autres plantes, libèrent sur le sol des débris organiques qui entrent dans une chaîne trophique impliquant les organismes et microorganismes du sol, ce qui conduit à l'enrichissement en matière organique. Ces phénomènes de pédogenèse permettent l'augmentation de la diversité du couvert végétal avec l'installation d'autres plantes plus exigeantes. Le sol est donc littéralement le support de la diversité des milieux terrestres et rend de nombreux services, appelés services écosystémiques (Figure 1), qui sont classés en trois catégories : approvisionnement, régulation et culture (Dominati et al., 2010; Walter et al., 2014).

(adapté de Dominati et al., 2010)

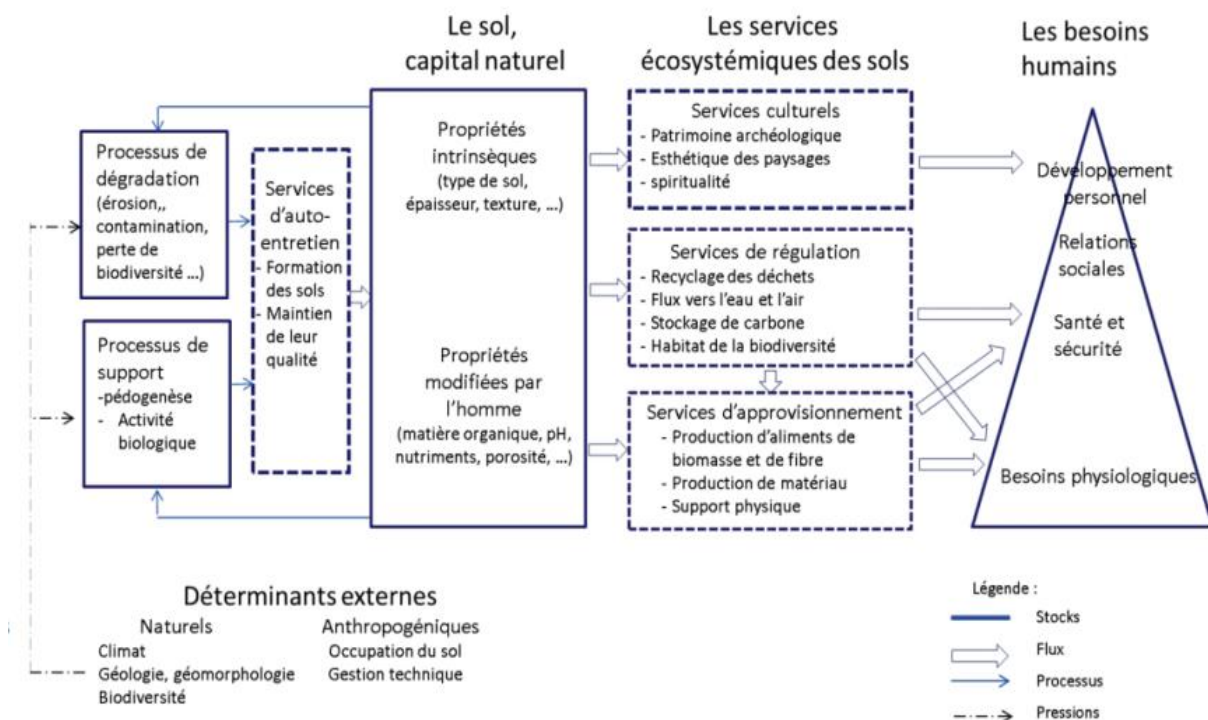


Figure 1 : Les services écosystémiques pouvant être rendus par les sols (Dominati et al., 2010).

Pourtant, les activités anthropiques libèrent de nombreux contaminants dans le sol, l'eau et l'air, ce qui cause le changement de la structure des écosystèmes et des services écosystémiques du sol (Dawson *et al.*, 2011). Ainsi, les pressions foncières, industrielles, agricoles et les réseaux de transports toujours grandissants dans un monde où la population pourrait continuer à s'accroître durant le siècle à venir (Gerland *et al.*, 2014) restreignent les surfaces des sols de qualité. De plus, malgré son abondance apparente, le sol se forme à des vitesses lentes à l'échelle de temps humaine. En effet, la pédogenèse produit une épaisseur de sol comprise entre 0.002 et 0.09 mm.an<sup>-1</sup> (Alexander, 1988). Ainsi, c'est environ 3,5 milliards d'hectares de terres qui ont été dégradés au fil du temps par les activités humaines, soit 30 % de la surface terrestre mondiale (Hüttermann *et al.*, 2009).

En Europe, ce sont près de 2,5 millions de sites qui sont considérés comme « potentiellement contaminés » et 342 000 sont identifiés comme étant « effectivement contaminés ». Les principaux secteurs d'activités qui contribuent à la contamination des sols sont les déchets industriels et municipaux (38%) et le secteur industriel et commercial (34%). La gestion de ces sites en Europe induit un coût d'environ 6 milliards d'€ par an. Les deux principaux contaminants des sites et sols pollués en Europe sont les huiles minérales (des hydrocarbures comme le pétrole) et les métaux lourds qui contribuent à eux deux à 60 % de la contamination. Les données rassemblées dans 33 pays de l'union européenne entre 2011 et 2012 montrent que sur 1 355 000 sites référencés, 127 000 sont des zones contaminées, les autres n'étant que potentiellement contaminées. De plus, sur l'ensemble de ces sites contaminés, 58 000 font l'objet d'une gestion pour la réhabilitation des sols (projet de remédiation) (Panagos *et al.*, 2013).

En France, les sites pollués font l'objet d'un suivi détaillé et les résultats sont rendus publics sur deux bases de données :

- ✓ la base de données BASOL<sup>1</sup> gérée par le ministère de la Transition écologique et solidaire (MTE) qui réalise l'inventaire des sites et sols pollués (ou potentiellement pollués) appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif. Sur les 6491 sites inscrits, 3682 disposent d'une surveillance, 1517 ne justifient pas la surveillance et 1292 ne sont pas encore surveillés. La base de données révèle qu'en France les contaminants présents dans l'environnement sont principalement les hydrocarbures et le plomb (Figure 2).
- ✓ ii) la base de données BASIAS<sup>2</sup>, gérée par le bureau de recherches géologiques et minières (BRGM) qui recense de façon plus large et systématique tous les sites industriels abandonnés ou non, susceptibles d'engendrer une contamination dans l'environnement, de conserver la

---

<sup>1</sup> <http://basol.developpement-durable.gouv.fr/>

<sup>2</sup> <http://www.georisques.gouv.fr/dossiers/inventaire-historique-des-sites-industriels-et-activites-de-service-basias#/>

mémoire de ces sites et de fournir des informations utiles aux acteurs de l'urbanisme, du foncier et de protection de l'environnement (350 000 sites).

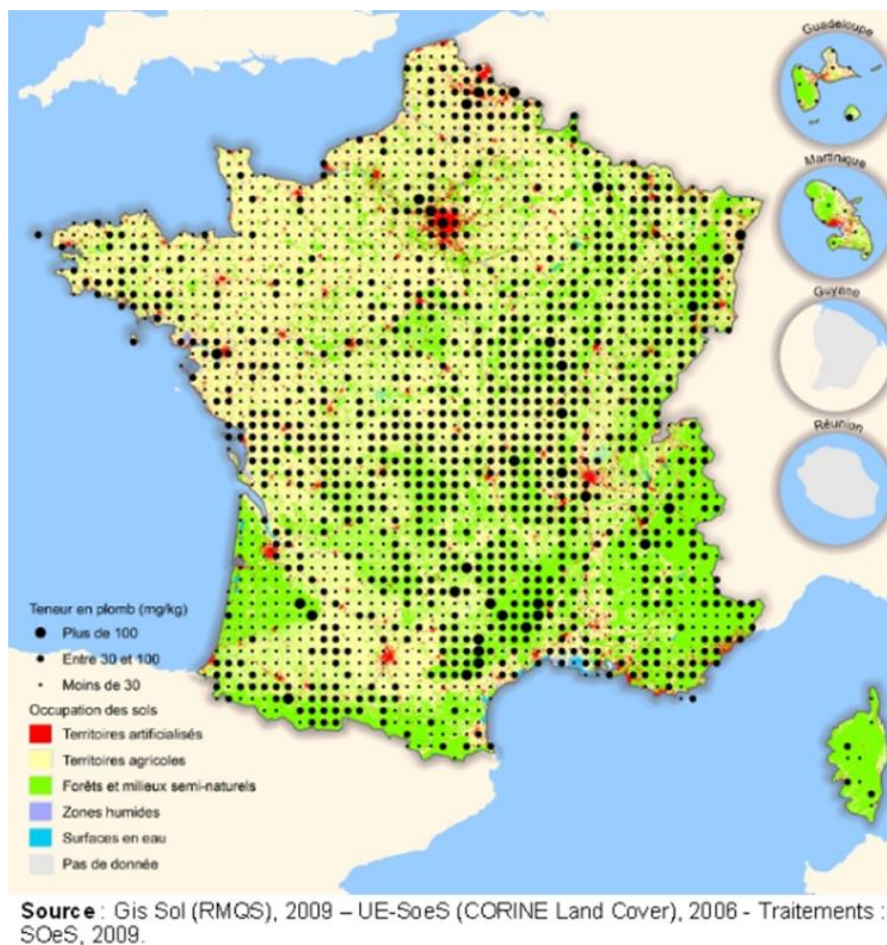


Figure 2 : Teneurs totales en plomb dans les sols de France mesurées sur la période 2000-2009, de 0 à 30 cm de profondeur. Commissariat général au Développement durable mis à jour le 13/10/2014<sup>3</sup>.

### 1.1.2 Définition des Éléments Traces Métalliques

Dans les sols se trouvent divers contaminants organiques comme des solvants chlorés, des pesticides, des insecticides, du toluène et du xylène ou encore des explosifs comme le trinitrotoluène (TNT), mais les principaux contaminants organiques en Europe sont les hydrocarbures, principalement les huiles minérales (pétroles) ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Glick, 2003). Cependant, selon l'Agence Européenne de l'Environnement (AEE), les métaux lourds, non dégradables et persistants, représentent la première source de pollution et, les principaux contaminants inorganiques des sols (Zhuang *et al.*, 2007). En effet, près de 38 % des sites contaminés européens le sont par les métaux lourds (Figure 3).

<sup>3</sup> <http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/272/1122/contamination-sols-metaux-metalloides.html>

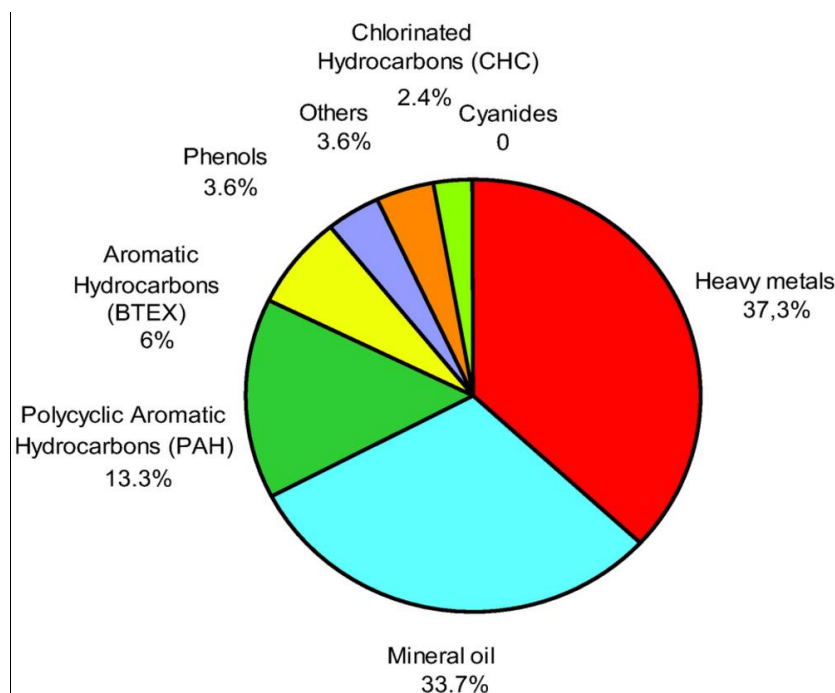


Figure 3 : Les contaminants affectant le sol et les eaux souterraines en Europe (AEE 2017)<sup>4</sup>.

Les métaux sont des éléments qui participent aux réactions chimiques sous forme de cations et jouent un rôle important dans les processus de la vie d'une cellule. Certains de ces cations métalliques sont essentiels pour le fonctionnement normal d'une cellule telle que le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), le cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ), le chromium ( $\text{Cr}^{3+}$  et  $\text{Cr}^{6+}$ ), le cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), le fer ( $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ ), le potassium ( $\text{K}^+$ ), le magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), le manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ), le sodium ( $\text{Na}^+$ ), le nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) et le zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ). D'autres n'ont aucun rôle biologique comme l'argent ( $\text{Ag}^+$ ), l'aluminium ( $\text{Al}^{3+}$ ), le béryllium ( $\text{Be}^{2+}$ ), le cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ), l'or ( $\text{Au}^{3+}$ ), le plomb ( $\text{Pb}^{2+}$ ) et le mercure ( $\text{Hg}^{2+}$ ) (Bruins *et al.*, 2000). Tous les métaux, essentiels ou non, sont toxiques pour la cellule au-dessus de certains seuils de concentration dans le milieu. Pour les organismes, il est question d'un seuil de toxicité, au-delà duquel les premiers effets néfastes sont notoires. Ce seuil peut être affecté par les nombreux paramètres physico-chimiques de l'environnement externe à l'organisme qui va jouer sur la biodisponibilité du métal, mais il est également influencé par les nombreuses propriétés de l'organisme qui peut avoir développé des parades face à l'élément toxique. Ainsi, la notion de toxicité est toute relative et nous la détaillerons par la suite. Parmi les éléments métalliques les plus toxiques se trouvent les métaux lourds, ainsi nommés du fait de leur masse volumique importante qui se doit d'être supérieure à  $5 \text{ g.cm}^{-3}$  et dont le numéro atomique est supérieur à 20, ils forment aussi des précipités insolubles avec le sulfure (Wang & Chen, 2006).

<sup>4</sup> <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites/progress-in-management-of-contaminated-1>

Cette terminologie est peu à peu abandonnée dans le cadre scientifique pour laisser place au terme d'éléments traces (ET) ou « trace element (TE) » en anglais. Ceci a facilité le regroupement des métaux lourds avec des métaux plus légers tels que l'Al ou le Be et avec des éléments non métalliques mais aux caractéristiques physicochimiques proches comme l'arsenic (As) ou le sélénium (Se). Les ETs les plus toxiques sont les suivants : As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se et Zn. Notons que les ETs qui sont des métaux sont nommés éléments traces métalliques (ETMs) et dans la suite de ce manuscrit nous nous concentrerons sur ces ETMs. En géochimie, le terme est utilisé pour les éléments présents à moins de 0,1 % ( $1000 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) dans la croûte terrestre et en biologie à moins de 0,01 % dans l'organisme (Kabata-Pendias, 2010). La définition du terme ETMs est donc relativement ambiguë. Dans le cadre de cette thèse nous utiliserons la définition de l'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC) adaptée à la biologie pour définir le terme ETM tel que suit : un ETM est un élément ayant une concentration moyenne de moins de 100 parties par million (ppm) d'atomes ou moins de  $100 \mu\text{g.g}^{-1}$  dans les tissus vivants. De plus, nous privilégierons la notion d'ETMs plutôt que de métaux lourds.

### 1.1.3 Origines naturelles et anthropiques des ETMs

L'origine naturelle des ETMs dans l'environnement réside dans l'évolution pédo-génétique des matériaux parentaux initialement présents. Précisons que la pédologie est l'étude scientifique des sols qui permet notamment de les classer les uns par rapport aux autres en fonction de leurs propriétés actuelles (Figure 4).

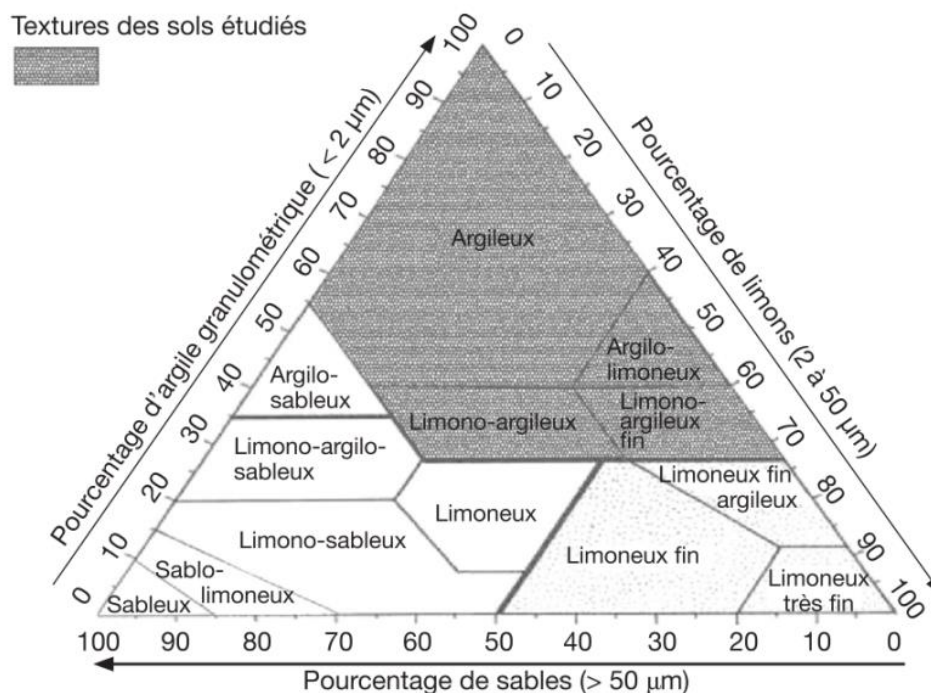


Figure 4 : Définition de la texture d'un sol en pédologie (Dridi & Zemmouri, 2012).

Le fond pédo-géochimique naturel (FPGN) correspond à la concentration d'un élément dans un sol après les évolutions géologiques et pédologiques naturelles en excluant les interventions humaines. Au niveau local, la composition chimique de la roche mère et son histoire pédo-géochimique vont influencer la teneur constatée à l'heure actuelle en oligo-éléments et en éléments toxiques. Le FPGN est une définition très localisée puisque, au cours de son histoire, le sol va se diversifier horizontalement, d'une parcelle à l'autre, mais aussi verticalement, d'un horizon du sol à l'autre, par l'action de nombreux processus. Les processus dont il est question sont l'altération, le lessivage, la lixiviation, les cycles biogéochimiques ou encore les dépôts aériens (Baize, 2009).

En effet, le FPGN peut être modifié par des processus de transferts pédologiques verticaux et horizontaux liés aux précipitations et impliquant les phénomènes de lessivage et de lixiviation. Notons que le lessivage désigne l'entraînement de particules solides tandis que la lixiviation implique des éléments solubles dans l'eau. Les éléments peuvent aussi bien migrer horizontalement que verticalement et peuvent potentiellement migrer vers des horizons du sol profonds où se situent des nappes phréatiques. Par ailleurs, le phénomène d'altération est défini comme une transformation d'un élément par l'action de l'eau, qui, sans rentrer dans les détails, implique les notions de pression et de température. Le climat a donc un impact important sur le FPGN. De plus, le cycle biogéochimique des organismes du sol (principalement micro-organismes et invertébrés) et des plantes intervient fortement dans la modification locale du FPGN. En effet, les plantes puisent et transforment des éléments nutritifs présents dans le sol avant que le processus de sénescence de ces plantes n'entraîne le retour de ces éléments au sol où les décomposeurs de la matière organique vont les transformer à nouveau. Les éléments ainsi impliqués dans ce cycle peuvent être fixés sur place ou transportés à des échelles de distances variables, via le compartiment biologique, avant de retourner au sol. En outre, le FPGN est également modifié par l'érosion aérienne dont découle un flux de particules fines qui, libérées dans l'atmosphère, peuvent enrichir des sols par déposition. Les distances de dispersion sont très variables selon la vitesse du vent, la taille des particules, la topographie et le couvert végétal. L'impact de ce processus sur le FPGN reste difficile à évaluer du fait des nombreuses variables. Cette forme de pollution est le plus souvent détectée par l'utilisation de bio-indicateurs sensibles. La mesure du FPGN en amont est essentielle pour estimer le bruit de fond d'un ETM et ainsi évaluer la contamination d'un milieu par des activités anthropiques. En définitive, des métaux comme le Pb, le Cd, le Cu, le Zn, le Hg ou encore le Ni peuvent se retrouver localement et de façon naturelle à de fortes concentrations dans le sol ce qui permet, par ailleurs, leur exploitation par l'Homme.

L'utilisation directe ou indirecte des métaux dans nos sociétés implique une modification de la répartition des ETMs dans les sols et leur dissémination à l'échelle mondiale (Khan, 2005). Cette pollution d'origine anthropique a un impact environnemental visible et grandissant à l'origine de vastes zones de terres non cultivables dont la mise en culture est à risque pour la santé humaine (Garbisu et Alkorta, 2001). Ces dérèglements sont la conséquence de l'expansion des infrastructures urbaines, industrielles et de transport, ainsi que de l'intensification de l'agriculture. Les activités industrielles ont conduit à l'accumulation d'ETMs dans l'eau, le sol et l'atmosphère bien au-delà du FPGN principalement depuis les années 30 pour le Cd, le Pb et le Zn issues de la métallurgie et la sidérurgie. Les pollutions de ce type d'industrie peuvent être liées à l'activité même des usines ou au stockage de leurs déchets dans des friches industrielles. C'est également l'urbanisation galopante qui entraîne une augmentation de la production et la concentration de déchets contaminants, notamment du fait de la combustion des énergies fossiles pour la production d'énergie (par exemple le charbon et l'émission de Hg, Pacyna *et al.* 2010) ou le transport automobile (Pb). Les sols exploités par l'agriculture intensive s'enrichissent en ETMs du fait de l'utilisation de pesticides (As, Cu, Hg, Mn, Pb) et d'engrais phosphatés (Cd) (Baize *et al.*, 2007; Baize, 2009). L'utilisation du fumier et du lisier entraîne également une importante contamination par l'ensemble des ETMs les plus abondants (Zn, Cu, Mo, Ni, As). De nombreux autres apports en ETMs existent comme l'amendement calcique (Cr), les traitements phytosanitaires (Cu) ou encore les boues et composts (Pb, Hg). Pour ces horizons labourés, le FPGN est totalement perturbé par les divers apports et seule la notion de « teneur agricole habituelle » (TAH) est pertinente pour déterminer le bruit de fond en ETMs de ces zones.

#### **1.1.4 Toxicité des ETMs**

##### ***1.1.4.1 La biodisponibilité et spéciation dans les sols***

La toxicité d'un contaminant est intrinsèquement liée à sa capacité à être intégrée au compartiment biologique, le terme de biodisponibilité est couramment employé pour en rendre compte. La biodisponibilité d'une substance est définie comme « l'aptitude à pouvoir être absorbée à un instant donné ; c'est une caractéristique instantanée et elle est déterminée par plusieurs phénomènes successifs de nature physique, physico-chimique et chimique, biotique et abiotique » (Calvet *et al.*, 2005). Notons ici que cela fait de la biodisponibilité d'un ETMs une caractéristique très changeante dans le temps et l'espace influencée par de nombreux paramètres. La biodisponibilité des ETMs du sol est liée à la succession de deux étapes : la mobilisation des ETMs du sol, puis le transport par convection et diffusion moléculaire vers les



membranes des organismes vivants. Ensuite, la toxicité est effective lorsque se produit l'absorption au travers de la membrane de l'organisme et le transfert du contaminant vers les « sites de toxicité ». Plusieurs précisions sont à apporter à cette définition. Il existe la notion de phytodisponibilité d'un élément dans le sol, qui est définie comme la quantité d'ETMs capable de passer en solution et d'être absorbée par la plante (Qasim, 2015). Ce sont sous les formes d'ions libres que les ETMs sont les plus réactifs et les plus phytodisponibles. Plus récemment, une norme internationale (ISO 17402)<sup>5</sup> définit « la disponibilité environnementale » comme la fraction du contaminant potentiellement disponible pour des organismes, qui résultent de processus physico-chimiques de désorption et qui est absorbée par des processus physiologiques. La disponibilité environnementale comprend : i) une fraction disponible réelle ou la quantité réelle dissoute de polluant dans des conditions ambiantes, ou ii) une fraction potentiellement disponible, c'est-à-dire la quantité maximale qui peut être libérée dans les conditions (prédéfinies) du cas le plus pessimiste. La fraction disponible potentielle comprend la fraction disponible réelle.

Les ETMs présents dans l'environnement ne sont pas systématiquement incorporés dans le compartiment biologique, ils sont même peu mobiles en général. Ils peuvent être présents dans la solution de sol sous forme soluble, colloïdale ou particulaire et s'échangent depuis ce réservoir vers les argiles, la matière organique, les réseaux cristallins de minéraux, les résidus végétaux et animaux ou encore les oxydes et hydroxydes de Fe, Al ou Mn (Baize et Tercé 2002). Les ETMs peuvent persister des centaines ou des milliers d'années dans le sol et peuvent s'y accumuler de façon non négligeable. Pour autant, une part des ETMs peut diffuser dans l'eau ou le sol sous certaines formes. De plus, la spéciation des ETMs (type de la molécule chimique) est fortement corrélée à la biodisponibilité, elle est influencée par des facteurs physiques (pH, potentiel redox, capacité d'échange cationique, humidité, température), chimiques (solubilité des ETMs, teneur en éléments biodisponibles) et biologiques (solubilisation des ETMs par les racines et les organismes du sol). En définitive, la toxicité des ETMs est plus directement liée à leur biodisponibilité qu'à leur concentration dans le milieu.

Le Tableau 1 qui suit, fait référence aux principaux ETMs du sol, à leur concentration dans le FPGN, leurs formes toxiques et certaines de leurs utilisations dans l'industrie :

**Tableau 1 : Caractéristiques générales des principaux ETMs des sols d'après Rollin and Quiot 2006.**

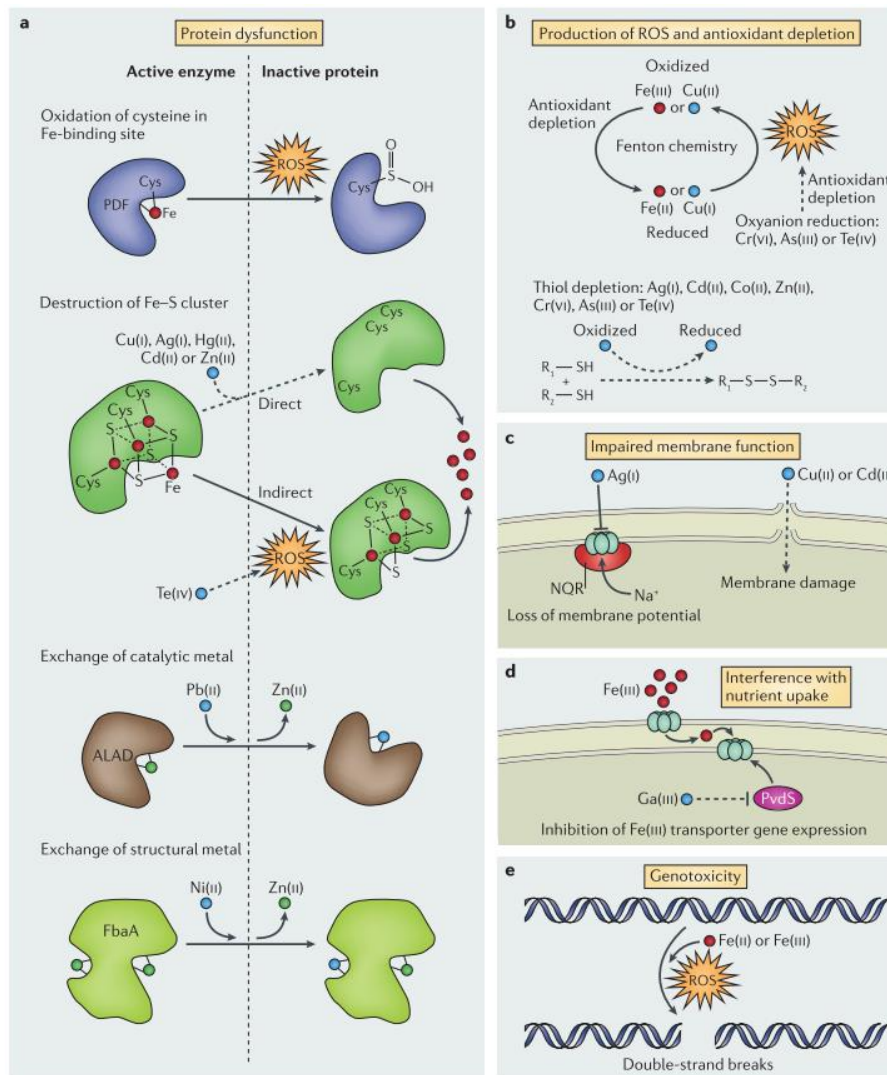
<b>ETM</b>	<b>FPGN moyen</b>	<b>Les formes les plus toxiques</b>	<b>Utilisations Industrielles</b>

<sup>5</sup> <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:17402:ed-1:v1:fr>

<b>As</b>	2 à 200 mg.kg <sup>-1</sup>	L'arsénite (As(III), AsO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) L'arsine (As(-III), AsH <sub>3</sub> ) L'arséniate (As(V), AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	Peu utilisé dans l'industrie, il a cependant par le passé été utilisé en tant que pesticide ou pour la préservation du bois
<b>Cd</b>	150 ng.kg <sup>-1</sup>	Les formes hydrolysées dont le Cd <sup>2+</sup> est le plus fréquent. Biodisponibilité à pH acide (inférieur à 6).	Le Cd est utilisé pour ses propriétés antifrictions dans de nombreux alliages notamment d'imprimerie, pour soudures et brasures ou les alliages à mémoire de forme.
<b>Cr</b>	100 à 200 mg.kg <sup>-1</sup>	Le chrome hexavalent (CrVI) L'ion chromate, HCrO <sub>4</sub> <sup>-</sup> L'ion dichromate, Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup> Biodisponibilité à pH alcalin.	Principalement utile dans le domaine de la métallurgie, de la chimie, du traitement de surface, de l'industrie du bois et de la fabrication de pigments
<b>Cu</b>	45 à 70 mg.kg <sup>-1</sup>	Les formes hydrolysées Cu <sup>+</sup> et Cu <sup>2+</sup> . Biodisponibilité à pH acide et dépend de la phase carbonatée et (hydr)oxyde.	Le Cu sert dans la fabrication de câbles et de fils électriques, dans la construction de rails, de pièces pour télévisions, de radios et montres, de radiateurs automobiles, et aussi dans la construction civile et l'architecture.
<b>Hg</b>	50 ng.kg <sup>-1</sup>	Le méthylmercure (MeHg) L'éthylmercure (EtHg) Transformer par des processus biotiques et abiotiques	A des propriétés très spécifiques qui le rend utile pour certains procédés industriels et chimiques : minage de l'or, de l'argent et du plomb, amalgame dentaire ou chlore-alcali.
<b>Ni</b>	20 et 100 mg.kg <sup>-1</sup>	Sa forme hydrolysée le Ni <sup>2+</sup> est présente à pH inférieur à 8.	Utilisé pour la production d'acier sans tache (inoxydable), de divers alliages et de batteries.
<b>Pb</b>	13 à 16 mg.kg <sup>-1</sup>	Pb <sup>+2</sup> et Pb <sup>+4</sup> et du fait de son caractère basique il ne s'hydrolyse qu'à des pH neutres ou alcalins.	Il a été utilisé dans les carburants automobiles et pour la soudure, l'industrie de la fonderie primaire, le recyclage, la métallurgie, le charbon et l'incinération des déchets.
<b>Se</b>	Se natif quasi nul	Le Séléniure (Se <sup>2-</sup> ) La Sélénite (SeO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ) Le Séléniate (SeO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) Biodisponibilité à pH alcalin.	Utile pour de nombreuses industries (composants électroniques, pigments, verre, caoutchouc, additifs alimentaires, catalyseurs, produits pharmaceutiques...)
<b>Zn</b>	70 et 132 mg.kg <sup>-1</sup>	La forme hydrolysée Zn <sup>2+</sup> uniquement à pH >7,7,	Galvanisation et formation d'alliage pour l'auto, la construction, l'électroménager, ...

#### 1.1.4.2 Effets toxiques des ETMs à l'échelle de la cellule et pour l'Homme

La toxicité des ETMs intervient à divers niveaux cellulaires et moléculaires, elle implique souvent la production par les ETMs d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des molécules à fortes affinités pour des atomes d'oxygènes comme H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> et <sup>•</sup>OH (Lemire *et al.*, 2013). Elle peut être divisée en cinq grandes classes (Figure 5) :



**Figure 5 : Les classes de toxicités des ETMs dans la cellule selon Lemire, Harrison et Turner 2013.**

- ✓ a. Le dysfonctionnement des protéines est induit via plusieurs phénomènes : i) l'oxydation des sites actifs protéiques par des ERO, ii) la rupture de liaison [4Fe-4S] protéique, soit directement par l'ETM soit indirectement par la production d'ERO, iii) la substitution d'un cation par un autre sur la protéine, soit sur un site catalytique, soit sur un site structurel.
- ✓ b. La réduction du pouvoir antioxydant et plus particulièrement une diminution de la réserve en glutathion est induite par les ERO produites par les ETMs qui forment des liens covalents avec les atomes de soufre.
- ✓ c. L'altération des fonctions membranaires liée à une peroxydation des lipides due au stress oxydatif ce qui entraîne une perte de l'intégrité membranaire et la perte du potentiel membranaire qui implique l'inactivation de certains transports transmembranaires.
- ✓ d. La diminution du transport de nutriment par inhibition de l'expression de certains gènes de transport comme, par exemple, le gène codant pour le peptide deformylase inhibé par le gallium, Ga (III), interfèrent pour le transport de Fe(III).
- ✓ e. La génotoxicité des ERO produites par les ETMs qui peuvent directement rompre les liaisons des brins d'acide désoxyribonucléique (ADN)

Les voies d'entrées des ETMs dans l'organisme sont multiples : ingestion, inhalation, pénétration cutanée ou même parentérale. Pour évaluer les risques pour l'Homme, il s'est avéré

nécessaire de mettre au point une mesure de la disponibilité des éléments toxiques chez l'Homme. La biodisponibilité orale est le paramètre d'évaluation du risque conçu par l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS)<sup>6</sup> qui consiste à simuler le système digestif humain (salive, acides gastriques, 37 °C,...) pour extraire les ETMs de l'échantillon (sol, produits manufacturés,...) (Oomen *et al.*, 2003). Il existe un consensus qui permet d'affirmer que des ETMs sont à l'origine de certains symptômes et de certaines maladies : l'arsenicisme (As), la maladie Itaï- Itaï (Cd), ulcère saignement de nez (CrVI), perturbations du système nerveux et endommagement de l'ADN (Hg), cancers (poumons, larynx et prostate) (Ni), le saturnisme (Pb), la fièvre des fondeurs (Zn, Pb, Cu, Mn)

#### 1.1.4.3 Les réglementations

La recherche sur les liens entre les intoxications par les ETMs et le développement de nombreuses maladies est très active, notamment vis-à-vis de l'autisme, des maladies chroniques et des désordres du système immunitaire ou reproductif. Depuis 2011, la contamination par les ETMs est reconnue comme un enjeu de santé publique par la commission européenne. De ce fait, des réglementations existent en Europe pour limiter l'impact de la pollution de l'eau et des sols sur la santé humaine et sont résumés dans un document de l'INERIS<sup>7</sup>.

- ✓ La directive du conseil 98/83/EC sur la qualité de l'eau attendue pour la consommation humaine en Europe adoptée le 3 novembre 1998 fixe des normes, notamment pour les ETMs<sup>8</sup>.

Cette directive fait suite aux recommandations de l'OMS en 2006.

**Tableau 2 : Valeurs limites pour des eaux destinées à la consommation humaine (Arrêté du 11 janvier 2007).**

ETM	Valeur paramétrique mg.l <sup>-1</sup>
As	0.01
Cd	0.005
Cr	0.05
Cu	2.0
Pb	0.01
Hg	0.001
Ni	0.02
Se	0.01
Zn	3 (recommandation de l'OMS)

- ✓ La directive n° 86-278 du 12/06/86 relative à la protection de l'environnement et notamment des sols, lors de l'utilisation des boues d'épuration en agriculture fixe des valeurs limites qui sont indiquées dans les tableaux ci-dessous (Tableau 3, Tableau 4 et Tableau 5)<sup>9</sup>.

<sup>6</sup> <http://www.ineris.fr/centredoc/bioaccess.pdf>

<sup>7</sup> [http://www.ineris.fr/centredoc/INERIS\\_DRC-07-86106-09249C.pdf](http://www.ineris.fr/centredoc/INERIS_DRC-07-86106-09249C.pdf)

<sup>8</sup> <https://www.lennotech.fr/applications/potable/normes/normes-ue-eau-potable.htm>

<sup>9</sup> [https://aida.ineris.fr/consultation\\_document/1081](https://aida.ineris.fr/consultation_document/1081)

**Tableau 3 : Valeurs limites de concentration en ETMs dans les sols pH 6-7 (Arrêté du 2 février 1998).**

ETMs dans les sols	Valeurs limites (mg.kg <sup>-1</sup> masse sèche)
Cd	2
Cu	100
Ni	50
Pb	100
Zn	300
Hg	1
Cr	150

**Tableau 4 : Valeurs limites de concentration en ETMs dans les boues destinées à leur valorisation en agriculture.**

ETMs dans les sols	Valeurs limites (mg.kg <sup>-1</sup> masse sèche)
Cd	20-40
Cu	1000 - 1750
Ni	300-400
Pb	750-1200
Zn	2500-4000
Hg	16-25
Cr	Non déterminé

**Tableau 5 : Valeurs limites pour les quantités annuelles d'ETMs pouvant être introduites dans les sols cultivés sur la base d'une moyenne de dix ans.**

ETMs dans les sols	Valeurs limites (mg.kg <sup>-1</sup> masse sèche)
Cd	0.15
Cu	12
Ni	3
Pb	15
Zn	30
Hg	0.1
Cr	Non déterminé

L'agence fédérale de santé publique des États Unis d'Amérique (USA) : Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)<sup>10</sup> classe les éléments selon leur dangerosité pour les habitants des USA sur la base de leur toxicité, leur temps de rétention dans l'environnement, leur propagation dans l'environnement et le nombre de sites prioritaires existant aux USA. Les métaux lourds apparaissent parmi les principales préoccupations du gouvernement des USA en 2015 en termes de risques liés à la pollution (Tableau 6). Par ailleurs, les Normes de Qualité Environnementale (NQE) sont définies dans le contexte réglementaire de la Directive Cadre sur l'Eau, ou DCE (2000/60/EC) qui établit une politique communautaire pour la gestion des eaux intérieures de surface, des eaux souterraines, des eaux de transition

<sup>10</sup><https://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>

(eaux estuariennes) et des eaux côtières, afin de prévenir et de réduire leur pollution, de promouvoir leur utilisation durable, de protéger leur environnement, d'améliorer l'état des écosystèmes aquatiques et d'atténuer les effets des inondations et des sécheresses. Notons que le FPGN du Hg a été estimé entre 5 et 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (Von Burg 1995; Canil et al. 2015). Pour les sols ordinaire la borne supérieure des concentrations a été fixée à 0.10 mg/kg. Pour les sédiments il n'existe pas de valeur de NQE. En effet, de nombreux composés ne disposent pas de valeur de référence. Cependant pour le mercure dans les sédiments, l'INERIS propose les concentrations limites suivantes :

- Mercure inorganique PNEC sédiment : 9,3 mg/kg - poids sec
- Mercure organique PNEC sédiment : 1,1 mg/kg - poids sec

\* PNEC : Concentrations sans effet prévisible pour l'environnement

**Tableau 6 : Classement des principaux ETMs parmi les contaminants prioritaires aux USA en 2015 (ATSDR).**

ETMs	Rang en 2015 sur 275 éléments classés
As	1 <sup>er</sup>
Cd	7 <sup>ème</sup>
Cr(VI)	17 <sup>ème</sup>
Cu	118 <sup>ème</sup>
Pb	2 <sup>ème</sup>
Hg	3 <sup>ème</sup>
Ni	57 <sup>ème</sup>
Se	145 <sup>ème</sup>
Zn	75 <sup>ème</sup>

## 1.1.5 Réhabilitation des sites et sols pollués

### 1.1.5.1 Généralités

Les techniques de réhabilitation des sites et sols pollués font appel à quatre grandes classes de procédés (Wang *et al.*, 2012a; Bert *et al.*, 2013)

- ✓ **Physicochimiques** : la stabilisation/solidification permet d'immobiliser des constituants dangereux d'une matrice tout en diminuant les zones de déchets et leur perméabilité. Cette méthode implique des liaisons physiques piégeant les contaminants à l'intérieur d'une masse stabilisée (solidification) ou induisant des réactions chimiques entre l'agent stabilisé et les contaminants pour réduire la mobilité (stabilisation). La stabilisation/solidification est le plus souvent une méthode *ex-situ* tandis que le procédé d'immobilisation est une méthode *in situ* impliquant des agents stabilisants qui peuvent être des ligands (contiennent souvent du sulfure), des agents réducteurs (réduction du Hg) ou des agents absorbants. Le lavage du sol est une méthode de traitement *ex situ* qui permet de séparer des constituants (particules métalliques) à partir de sols via une lixiviation chimique, la séparation physique ou des procédés physico-chimiques. Moins couramment utilisées, les techniques liées aux nanotechnologies reposent sur l'utilisation des particules dont la dimension est comprise entre 1 et 100 nm qui affectent la mobilité, la toxicité et la biodisponibilité des contaminants présents dans l'environnement.

- ✓ **Thermiques** : la désorption thermique est un procédé *ex-situ* qui utilise la chaleur pour augmenter la volatilité des contaminants pour ensuite les éliminer (séparations) à partir d'une matrice solide (généralement le sol) mais sans la combustion des médias et des contaminants. Par ailleurs, la vitrification est une technique d'immobilisation des contaminants dans un produit final vitrifié principalement utilisé pour assainir les sols contaminés par des métaux lourds mélangés à des éléments radioactifs d'installation militaire.
- ✓ **Confinements** : il s'agit simplement d'isoler les contaminants pour éviter les fuites vers les écosystèmes à proximité de la source.
- ✓ **Biologiques** : ce sont des techniques faisant appel à des végétaux et des microorganismes qui vont être introduits sur les sites contaminés pour réduire et restreindre la contamination tout en améliorant les services écosystémiques rendus par ces sols.

### 1.1.5.2 Les techniques biologiques de remédiation des sols

La phytoremédiation consiste à utiliser des plantes et des microorganismes pour pouvoir éliminer ou contenir la contamination du sol en absorbant ou détruisant les substances polluantes. La phytoremédiation des ETMs peut être classée en 3 sous-groupes majeurs :

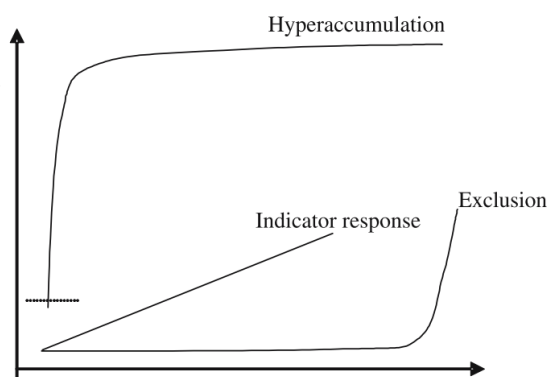


Figure 6 : Stratégies des plantes en réponse à l'augmentation de la concentration en nickel dans le sol (Baker, 1981).

- ✓ La phytoextraction (Arshad *et al.*, 2005; Kolbas *et al.*, 2011) des ETMs repose sur la capacité de la plante à extraire le métal depuis le sol vers ses parties aériennes ce qui dépend de ses caractéristiques physiologiques et génétiques. Il existe trois types de plantes : bioindicatrices, excluantes et hyperaccumulatrices (Figure 6). Pour les plantes bioindicatrices, la teneur en métal dans leurs tissus est proportionnelle à la teneur dans le sol. Les plantes excluantes, quant à elles, excrètent activement les métaux, en trop fortes concentrations, depuis leurs tissus vers le sol. Le système racinaire de certaines plantes est très efficace pour prospecter des sols : on parle de plantes hyperaccumulatrices. Ce procédé est efficace même pour des contaminations en ETMs diffus et, de plus, il peut être couplé avec l'ajout de chélateur pour améliorer l'extraction. Pour maximiser l'efficacité du processus, la plante doit répondre à plusieurs critères : avoir une production de biomasse importante et rapide, avoir des capacités d'hyperaccumulation et de translocation importantes, être résistante aux métaux, être adaptée au sol à traiter (souvent fortement perturbé), posséder un système racinaire étendu, et nécessiter peu d'entretien après plantation. Autant dire que ces plantes sont rares et beaucoup d'investigations sont nécessaires pour trouver les meilleurs candidats. Par ailleurs, le concept de phytomine (Nkrumah *et al.*, 2016) utilise les plantes hyperaccumulatrices aux abords d'exploitations minières ou de friches très fortement contaminées pour récupérer les métaux présents de façon diffuse dans le sol et les réintroduire dans le circuit industriel.

- ✓ La phytovolatilisation est possible pour certains ETMs qui peuvent se trouver en phase gazeuse tel que l'As, le Hg et le Se. Dans ce cadre, les plantes et les microorganismes sont capables de réaliser et d'amplifier la biotransformation des ETMs, telle que la réduction ou la méthylation, vers leurs formes volatiles qui sont relarguées dans l'atmosphère. La phytovolatilisation est plutôt appliquée à la dégradation de polluants organiques, les transformant en éléments volatiles moins ou pas toxiques et les relarguant dans l'atmosphère via leurs feuilles. Cependant, pour certaines substances, bien que la phytovolatilisation permette de décontaminer les sols, elle libère des substances toxiques dans l'atmosphère.
- ✓ La phytostabilisation (Kumpiene *et al.*, 2011; Lopareva-Pohu *et al.*, 2011) par opposition aux deux précédentes approches vise à fixer le contaminant dans le sol. Il s'agit d'une méthode utile lorsque les deux précédentes approches sont inapplicables et que le risque de l'élargissement de la contamination par érosion aérienne et hydraulique est important. En effet, les conditions météorologiques combinées à la pédo-géochimie des sites peuvent mener à des fuites de contaminants vers les nappes phréatiques et l'atmosphère. La présence de végétaux limite les érosions du sol, à la fois par l'action du système rhizosphérique en sous-sol et par l'action du couvert végétal au niveau atmosphérique. Les plantes qui sont sélectionnées pour ce type de phytoremédiation doivent répondre aux critères suivants : (i) avoir une forte tolérance aux ETMs présents dans le sol, (ii) présenter une croissance rapide de la partie aérienne et un système racinaire dense et étendu, (iii) disposer d'une forte capacité de rétention des ETMs au niveau racinaire, (iv) posséder une faible capacité de translocation des ETMs, (v) nécessiter un entretien réduit, et (vi) avoir une longévité importante (Philer *et al.*, 2010).

Dans le Tableau 7 se trouvent quelques définitions utiles pour éclairer le lecteur sur la terminologie utilisée dans le cadre de la phytoremédiation (Boopathy, 2000 ; Glick, 2003 ; Khan, 2005 ; Mrozik et Piotrowska-Seget, 2010).

**Tableau 7 : Terminologie dans le domaine de la phytoremédiation tirée de la littérature scientifique.**

Bioaugmentation :	Utilisation de microorganismes pour accélérer la remédiation des pollutions environnementales.
Bioremédiation :	Utilisation de microorganismes ou de procédés microbiens pour diminuer ou supprimer des pollutions environnementales.
Phytodégradation :	Utilisation des plantes et de leurs microorganismes associés pour dégrader des polluants, principalement des HAPs
Phytoextraction :	Absorption et concentration des métaux depuis le sol vers les racines et les parties aériennes d'une plante.
Phytomine :	Utilisation de plantes à croissance rapide et à fort taux d'accumulation d'ETMs pour le retour à un sol cultivable et pour l'exploitation des métaux piégés dans les parties aériennes des végétaux.
Phytoremédiation :	Utilisation de plantes pour extraire, détruire ou séquestrer des substances polluantes présentes dans l'environnement (sol, air et eau).
Phytostabilisation :	Utilisation des plantes pour limiter la lixiviation ou volatilisation des polluants et leur propagation dans l'environnement.



Phytovolatilisation	Utilisation des plantes qui absorbent l'eau de la lithosphère contenant des contaminants organiques puis les dégradent en composants moins ou non toxiques volatiles et les relarguent dans l'atmosphère.
Rhizofiltration :	Utilisation des racines de la plante pour extraire les métaux de la solution du sol.
Rhizoremédiation :	Utilisation des microorganismes de la rhizosphère pour améliorer la capacité de phytoextraction ou de phytodégradation par les plantes.
Translocation :	Transfert des polluants du système racinaire vers la partie aérienne de la plante.

### 1.1.5.3 Le phytomanagement

Le phytomanagement est une approche innovante et intégrative pour la gestion des sites et sols pollués qui considère le sol contaminé non seulement comme un site à réhabiliter mais aussi comme une ressource à exploiter. Le phytomanagement consiste à redonner à des sols délaissés et pollués une efficacité économique tout en améliorant les services écosystémiques rendus par le sol. Dans l'idéal, il s'agit de projets qui planifient sur le long terme le développement du territoire en plusieurs étapes (Figure 7), telles que définies par de nombreux outils d'aide à la décision, dont celui décrit récemment (Andersson-Sköld *et al.*, 2014) : (i) des données scientifiques récoltées en amont permettent de déterminer quelles plantes sont à utiliser selon les caractéristiques du site pour maximiser les chances d'implantation et de développement des cultures, et (ii) une stratégie de gestion du site et des risques est mise en place pour optimiser les gains économiques, environnementaux et sociaux.

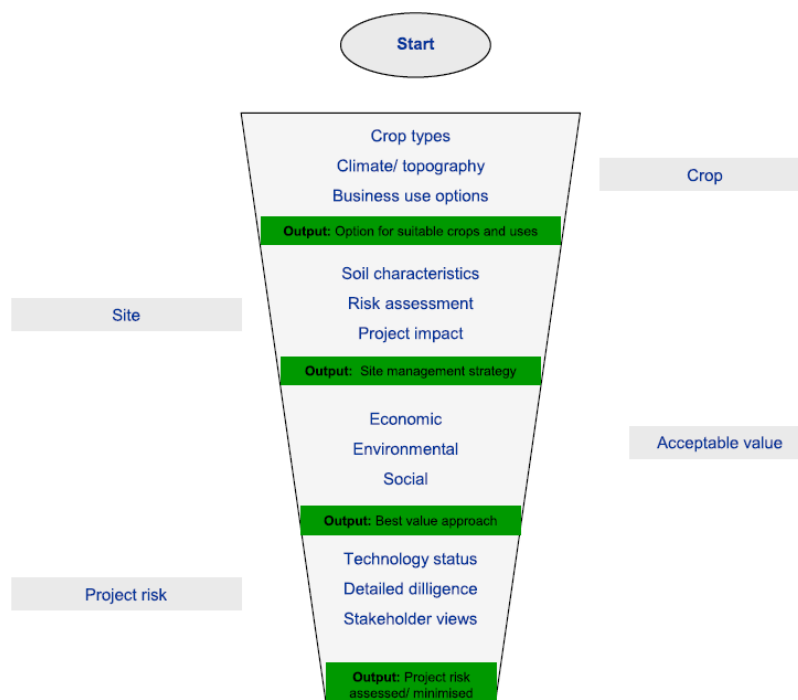


Figure 7 : Outils d'aide à la décision pour l'établissement d'un projet de phytomanagement selon Andersson-Sköld *et al.* (2014).

L'objectif économique induit de produire de la biomasse non alimentaire mais valorisable dans la filière fibre ou énergie principalement. Dans ces conditions, il est donc préférable d'utiliser des plantes produisant de fortes biomasses en peu de temps et qui n'accumulent pas ou peu les ETMs pour pouvoir être commercialisées. Le projet PHYTOPOP financé par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) dans le cadre du programme PRECODD<sup>11</sup> a permis d'établir le devenir des ETMs présents dans des peupliers cultivés sur des sites enrichis en ETMs lors du processus de conversion de la biomasse en énergie par combustion (Chalot *et al.*, 2012) ou par pyrolyse (Bert *et al.*, 2017). Ces travaux ont pu déboucher sur des recommandations quant à l'utilisation des biomasses issues de sols contaminés. Le phytomanagement est souvent couplé à des objectifs de phytostabilisation puisque les prérequis pour les plantes utilisées sont similaires. Dans le cadre du projet Ecosphère Continentale et Côtière (EC2CO) : Freidi-Hg<sup>12</sup> ont été combinées la production de biomasse (bois de chauffage) sur une friche industrielle et l'étude du cycle du Hg vis-à-vis du couvert végétal et des microorganismes associés. Ce sont souvent des espèces ligneuses qui répondent aux critères pour le phytomanagement. Citons par exemple le saule, le peuplier ou encore le miscanthus pour la production de bioénergie, mais aussi le hêtre, l'eucalyptus ou le bouleau pour la production de bois de construction (Figure 8).

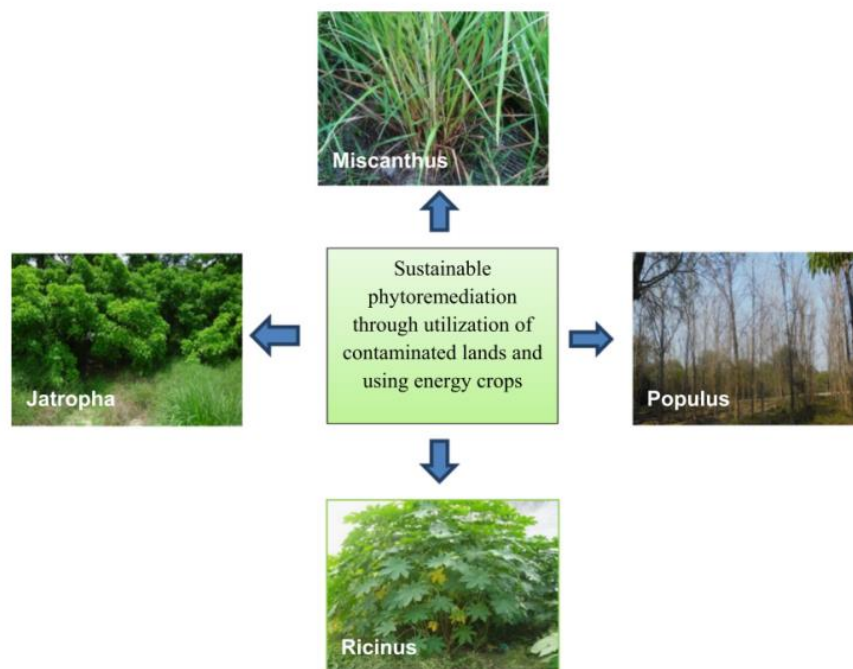


Figure 8 : Des exemples d'espèces végétales utiles en phytomanagement selon Pandey, Bajpai et Singh (2016).

<sup>11</sup> <http://www.agence-nationale-recherche.fr/suivi-bilan/historique-des-appels-a-projets/appel-detail1/programme-ecotechnologies-et-developpement-durable-precodd-2008/>

<sup>12</sup> <http://dendroremediation.univ-fcomte.fr/spip.php?rubrique26>

Le projet PROLIPHYT<sup>13</sup>, financé par l'Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie (ADEME) dans le cadre du Programme d'Investissements d'Avenir (PIA) et géré par le Laboratoire Chrono-Environnement (LCE) a pour objectif de déterminer les meilleurs candidats pour les projets de phytomanagement parmi un panel de plus de 50 espèces ligneuses réparties sur 4 sites expérimentaux. Par ailleurs, les productions de tournesol et de maïs sur ces sols peuvent être envisagées pour l'obtention respectivement de biofuels et de bioéthanol, sans pour autant empiéter sur des surfaces agricoles.

Bien que l'efficacité des procédés biologiques soit dépendante de la production de biomasse et des conditions environnementales, ces techniques sont moins coûteuses que les autres procédés, permettent de gérer des pollutions plus diffuses et, *in-situ*, rendent des services écosystémiques que des procédés classiques ne pourraient fournir. Alors que le temps de croissance des plantes reste un frein pour l'application des procédés de phytoremédiation puisque les sites traités ne sont plus exploitables par le propriétaire pour un temps long, le phytomanagement apporte une viabilité économique qui tend à lever ces freins.

Comme le succès du processus de phytoremédiation dépend d'une part de la capacité de la plante à résister à la toxicité des contaminants et, d'autre part, de la capacité à produire la biomasse adéquate, les microorganismes promoteurs de la santé et de la croissance des plantes (PGP: « Plant Growth Promoting ») ont beaucoup attiré l'attention des chercheurs dans l'optique de produire des inocula bactériens ou fongiques. Les champignons ont déjà montré leur efficacité lors de l'implantation de peupleraies sur des sites de phytomanagement avec un accroissement significatif de la productivité des parcelles de peupliers préalablement inoculés avec des champignons symbiotiques (Ciadamidaro *et al.*, 2017). Les bactéries sont notamment recherchées pour leurs capacités à stimuler l'acquisition des éléments nutritifs, à immobiliser / mobiliser les métaux lourds dans le sol, à recycler les nutriments et à améliorer la résistance aux pathogènes (Rajkumar *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2016; Santoyo *et al.*, 2016).

De ce fait, de nombreuses études ont cherché à utiliser les microorganismes PGP comme un levier pour favoriser l'implantation et la croissance des plantes dans des conditions de stress. Alors que les approches de cultures dépendantes ne permettent d'obtenir qu'entre 0,1 et 3 % des microorganismes réellement présents dans un habitat, l'apparition de la génomique environnementale a engendré un nouveau champ d'étude pour la compréhension des écosystèmes microscopiques, et notamment ceux inféodés aux plantes et aux sols.

---

<sup>13</sup> <http://dendroremediation.univ-fcomte.fr/spip.php?rubrique64>

Les chapitres qui suivent vont, dans un premier temps, présenter les connaissances scientifiques sur les communautés de microorganismes associées aux plantes aussi bien au niveau de la rhizosphère que de la phyllosphère, puis, dans un second temps, proposent de développer les technologies de la génomique environnementale permettant de caractériser les microbiomes.

## 1.2 Les communautés microbiennes associées aux plantes

### 1.2.1 L'écosystème rhizosphérique

#### 1.2.1.1 L'habitat rhizosphérique

La rhizosphère est « la portion du sol qui forme l'habitat complexe des racines du couvert végétal et dont la composition est altérée par l'activité racinaire » (selon Hiltner dans Mantelin et Touraine, 2004). Plus simplement, il s'agit du volume de sol adhérent aux racines et sous leur influence. L'intense activité microbienne est la caractéristique essentielle de la rhizosphère. Elle est due à la libération dans le sol de composés carbonés (les rhizodépôts) qui stimulent la croissance et le développement des microorganismes du sol. L'influence des racines sur l'activité des microorganismes est appelée « effet rhizosphère ». L'intense activité microbienne dans, sur et autour de la racine, résulte de la libération dans le sol d'une grande variété de composés organiques servant de source de carbone, voire d'azote et d'énergie pour les microorganismes. C'est le processus d'exsudation racinaire appelé rhizodéposition, qui est commun à toutes les plantes supérieures (Dakora et Phillips 2002 ; Dennis *et al.*, 2010) (Tableau 8).

Tableau 8 : Types de rhizodépôts produits par les végétaux (Dakora & Phillips, 2002).

Amino acids	Organic acids	Sugars	Vitamins	Purines/nucleosides	Enzymes	Inorganic ions and gaseous molecules
$\alpha$ -alanine	citric	glucose	biotin	adenine	acid/alkaline-	$\text{HCO}_3^-$
$\beta$ -alanine	oxalic	fructose	thiamin	guanine	phosphatase	$\text{OH}^-$
asparagine	malic	galactose	niacin	cytidine	invertase	$\text{H}^+$
aspartate	fumaric	maltose	pantothenate	uridine	amylase	$\text{CO}_2$
cystein	succinic	ribose	riboflavin		protease	$\text{H}_2$
cystine	acetic	xylose				
glutamate	butyric	rhamnose				
glycine	valeric	arabinose				
isoleucine	glycolic	raffinose				
leucine	piscidic	desoxyribose				
lysine	formic	oligosaccharides				
methionine	aconitic					
serine	lactic					
threonine	pyruvic					
proline	glutaric					
valine	malonic					
tryptophan	aldonic					
ornithine	erythronic					
histidine	tetronic					
arginine						
homoserine						
phenylalanine						
$\gamma$ -Aminobutyric acid						
$\alpha$ -Aminoadipic acid						

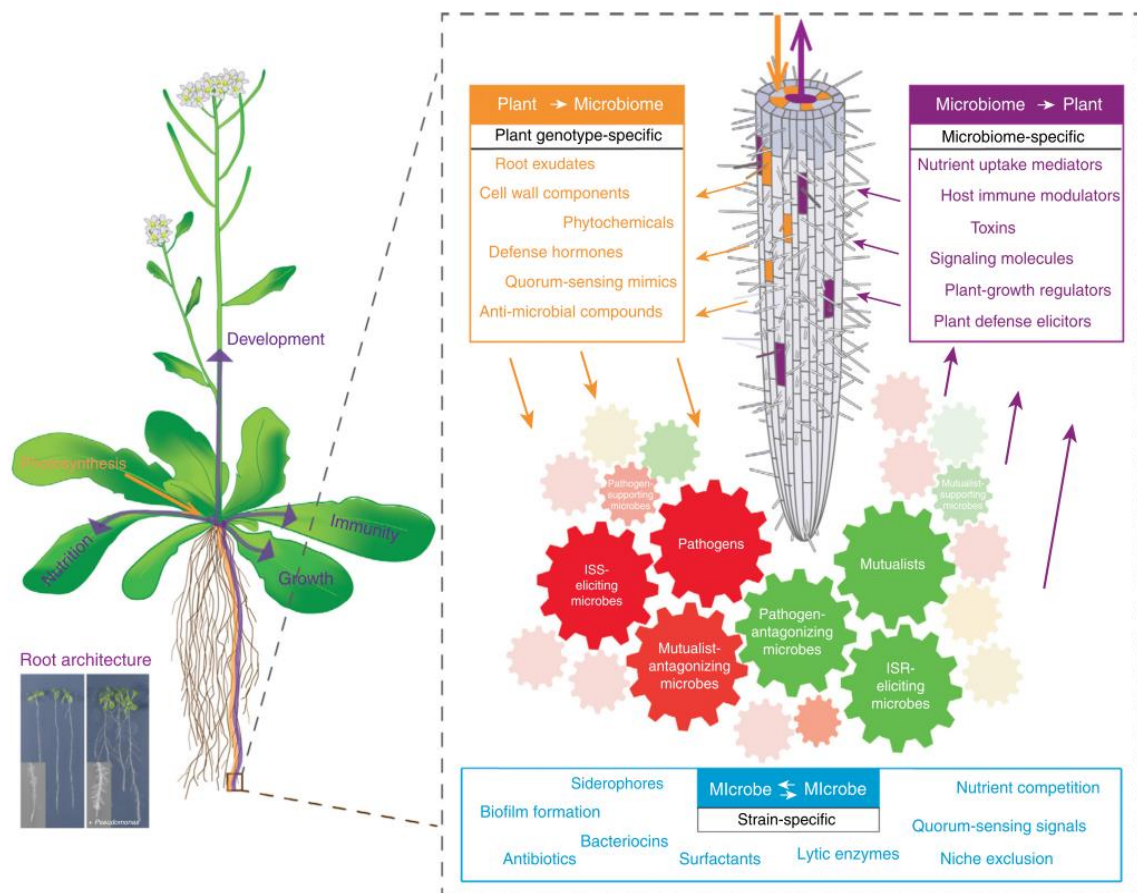
La rhizodéposition varie selon des paramètres tels que la température, la lumière ou encore le  $\text{CO}_2$  atmosphérique (Baudoin *et al.*, 2003). Ces dépôts carbonés ont ainsi une forte incidence sur les communautés microbiennes autochtones de la rhizosphère qui développeront

des activités particulières. Ainsi, selon les espèces végétales, les communautés microbiennes sont différentes (Ibekwe et Kennedy, 1999 ; Inceoğlu *et al.* 2010) et il est couramment admis que les différences qualitatives et quantitatives des exsudats issus d'un couvert végétal constituent un facteur de variation de la structure de la communauté microbienne (Gao *et al.*, 2010 ; Das *et al.* 2017). En conséquence, suivant la qualité et la quantité des rhizodépôts, certaines communautés bactériennes, plutôt que d'autres, vont coloniser la rhizosphère des plantes (Ma *et al.*, 2009a ; Gao *et al.*, 2011). D'après Gao et ses collaborateurs (2011), la taille de la population bactérienne du sol diminue selon les critères suivants : sol non pollué végétalisé > co-culture (2 espèces) sur sol pollué en ETM > monoculture sur sol pollué en ETM > sol pollué nu. Ainsi, la coexistence de différentes espèces végétales permet d'une part, l'augmentation de la taille de la communauté microbienne de 15 à 20 % par rapport à la monoculture et corrélativement une stimulation de certaines fonctions de ces microbes (Gao *et al.*, 2010 ; Gao *et al.*, 2011) et d'autre part, la mise en place d'une communauté microbienne complexe et des groupes fonctionnels microbiens plus diversifiés (Lavelle *et al.*, 1995). La rhizosphère est donc un habitat riche et hospitalier facilitant le vie microbienne, et malgré tout, la consommation de nutriments par les bactéries est telle que les composés carbonés et azotés sont toujours limitant et d'après plusieurs auteurs il est rare que plus de 15 % de la surface racinaire soit colonisée (Loon & Bakker, 2006; Choudhary & Johri, 2009).

### **1.2.1.2 Les microorganismes de la rhizosphère**

Les microorganismes sont partout, ils se développent malgré des conditions extrêmes qui sembleraient rédhitoires pour tout organisme, et dans l'ensemble de ses habitats, ils jouent un rôle crucial dans l'équilibre des cycles biogéochimiques. Cependant, s'il y a un habitat qui a particulièrement été étudié et où les microorganismes jouent un rôle fondamental pour l'Homme, c'est la rhizosphère. Il a été montré que des relations se créent dans l'écosystème rhizosphérique au sein des communautés de microorganismes et entre les microbes et la plante (Figure 9). La plante investit une partie de ses ressources pour entretenir des relations avec les microorganismes de la rhizosphère. En un sens, elle façonne la communauté de microorganismes autour de ses racines en libérant dans l'habitat rhizosphérique une partie du carbone qu'elle fixe par photosynthèse. Cette libération conduit à un échange mutuellement bénéfique puisque les microorganismes vont être bénéfiques en termes de croissance de développement, de nutrition ou encore d'immunité pour la plante. Sur la Figure 9 (Pieterse *et al.*, 2016) le cadre orange regroupe les phénomènes liés au génotype de la plante : métabolisme des racines, fonctionnement du système immunitaire, et à la composition des exsudats qui,

ensemble, influent sur la structure de la communauté de microorganismes de la rhizosphère. Le cadre bleu représente les interactions microbes-microbes, il regroupe les activités des microorganismes variables en fonction des souches qui vont avoir un rôle antimicrobien ou probiotique et donc respectivement inhiber ou améliorer la croissance des autres microorganismes. Finalement, le cadre violet présente les services apportés collectivement par les microorganismes de la rhizosphère: transformation de l'architecture des systèmes racinaires, améliorer l'accumulation de la nutrition et activer les systèmes immunitaires par «induced systemic resistance/suppression» (ISR/S).



Trends in Plant Science

Figure 9 : Les interactions au sein de la rhizosphère impliquant la plante et les microorganismes (Pieterse *et al.*, 2016).

Ainsi, les microorganismes qui colonisent la rhizosphère sont classés selon les relations qu'ils établissent avec les plantes qui leur fournissent leur habitat. Sont définies trois catégories d'organismes : les agents pathogènes, les organismes commensaux, et ceux qui sont bénéfiques à la croissance de la plante. Le succès relatif d'un microorganisme quel que soit sa catégorie est dépendant des relations synergétiques et antagonistes s'établissant avec les autres microorganismes de la communauté. Pour les microorganismes bénéfiques, il est possible de distinguer deux grands groupes dans le cas des bactéries telluriques : ceux établissant une

relation symbiotique avec la plante hôte et ceux non symbiotiques vivant librement dans le sol (Mantelin et Touraine, 2004). La relation de symbiose implique généralement la formation de structures spécialisées comme les nodosités sur les racines de la plante (Penrose et Glick, 2003). Les bactéries du genre *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer*, *Frankia*, *Mesorhizobium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* and *Rhizobium* (Kloepper *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 2012b; Glick, 2014; De Meyer *et al.*, 2015) font partie de ce premier groupe et sont qualifiées de « plant growth promoting rhizobacteria » symbiotique (PGPR).

Le second groupe est composé de bactéries vivant librement dans le sol, à proximité des racines, et sont souvent mentionnées comme étant des PGPR rhizosphériques (Vessey, 2003). Elles appartiennent à différents genres, parmi lesquels *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, et *Serratia* (Benizri *et al.*, 2001 ; Calvo, Nelson and Kloepper 2014; Glick 2014). Les nombreux métabolites produits par ces souches PGPR peuvent être classés en fonction du type d'action qu'ils vont provoquer, impliquant des effets indirects ou directs, que nous développerons ci-après. Le mode d'action indirect s'observe en présence d'un agent pathogène. Il conduit à une modification des équilibres microbiens dans la rhizosphère qui aboutira à une protection de la plante par suppression des microorganismes nuisibles. Par un mode d'action direct, les bactéries stimulent la croissance des plantes, même en absence d'agent pathogène (Glick *et al.*, 1999 ; Vessey, 2003 ; Khan 2005; Chen *et al.* 2013; Hussein and Joo 2014).

D'autres bactéries dites PGPB endophytes sont des organismes commensaux, dont une des premières définitions est la suivante: « il s'agit de bactéries non-pathogéniques endophytes originaires des communautés de bactéries épiphytes de la rhizosphère et de la phyllosphère aussi bien que des primo-endophytes présents dans la graine ou le matériel végétal de plantation» (Hallmann *et al.*, 1997). Ces bactéries proviennent de nombreux genres : *Acinetobacter*, *Aminobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Devosia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Phyllobacterium*, *Rahnella*, *Shinella*, *Sphingomonas* and *Staphylococcus* (Doty *et al.*, 2009; Compant *et al.*, 2009; De Meyer *et al.*, 2015).

En général, les bactéries doivent développer des compétences adaptatives spécifiques de leur habitat qu'elles soient dans, sur ou à proximité des racines. Des traits caractéristiques connus ont été résumés dans les travaux de Compant et ses collaborateurs (2009) (Tableau 9).



**Tableau 9 : Compétences bactériennes connues et requises dans la rhizosphère, le rhizoplan et/ou l'endosphère par les PGPB (Compant et al., 2009).**

Rhizosphere and rhizoplane competence	Endophytic competence
Chemotaxis	Flagella
Bacterial growth rate	Nod genes
Quorum sensing	Cell-wall degrading enzymes
Amino acid synthesis	Detoxification mechanisms
Vitamin B1 synthesis	Type IV pili
NADH dehydrogenase I	Twitching motility
O-antigenic site of LPS	LPS
Flagella	
Fimbriae	
Outer membrane protein	
Agglutinin	
Type IV pili	
Antibiotic secretion	
Siderophore production	
Site specific recombinase	

Des PGPB ont été isolées de sols pollués (Hussein & Joo, 2014; Rangel *et al.*, 2017), et utilisées pour améliorer la phytoextraction par exemple du Ni (Cabello-Conejo *et al.*, 2014; Benizri *et al.*, 2016), du Cd (Chen *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2014), du Zn (Dabrowska *et al.*, 2016). Pour d'autres, il a été démontrée qu'elles pouvaient participer à la phytoremédiation de l'As et du Hg (Franchi *et al.*, 2016). De nombreuses revues présentent les conclusions et les perspectives des recherches sur la phytoextraction aidée par les PGPB (Sessitsch *et al.*, 2013b; Ahemad & Kibret, 2014; Ullah *et al.*, 2015; Ashraf *et al.*, 2017).

Les champignons telluriques bénéfiques pour la plante se répartissent en deux groupes, les champignons mycorhiziens qui établissent une symbiose obligatoire avec les racines de la plante et les endophytes racinaires qui sont des organismes mutualistes pouvant donc établir des interactions mutuellement bénéfiques avec la plante. Les mycorhizes sont des symbioses entre un champignon mycorhizien et les racines d'une plante, où il a été montré que le champignon apporte de l'azote et du phosphore à la plante tandis que cette dernière fournit du carbone sous forme de photosynthétats (Koorem *et al.*, 2017). De plus, ces champignons ont un rôle actif pour la biodisponibilité des ETMs des sols, pouvant soit augmenter la phytoextraction, soit la diminuer en séquestrant les ETMs (Cabral *et al.*, 2015). Les champignons mycorhiziens sont subdivisés en deux classes, les endomycorhiziens et les ectomycorhiziens, toutes deux ont fait l'objet d'études qui ont montré leur rôle essentiel pour l'installation et la croissance des plantes sur des sols pollués aux ETMs (Leung *et al.*, 2013). Les endomycorhiziens forment des structures permettant les échanges à l'intérieur de la racine de la plante tandis que l'hyphe se

prolonge à l'extérieur. Ils sont essentiellement représentés par la classe des *Glomeromycota* qui entrent en symbiose avec les Angiospermes, les Gymnospermes et les Ptéridophytes (Tableau 10).

Tableau 10 : Les groupes taxonomiques (Phylla) au sein des champignons (Gavériaux, 2012).

<b>Chytridiomycota</b>	Descendants actuels des plus anciens <i>Mycota</i> apparus la Terre ; ils ont des cellules mobiles munies d'un flagelle postérieur.
<b>Entomophthoromycotina</b>	Parasites (pf. saprophytes), présence de zoospores uniflagellées, avec une alternance de générations haploïdes et diploïdes.
<b>Zoopagomycotina</b>	Parasites de champignons ou d'amibes (autrefois dans les zygomycètes (quelques dizaines d'espèces).
<b>Kickxellomycotina</b>	Les hyphes possèdent au niveau de leurs cloisons des pores lenticulaires (ce sont des parasites ou des commensaux)
<b>Mucormycotina</b>	Correspondent à la plupart des espèces autrefois placées dans les Zygomycètes.
<b>Neocallimastigomycota</b>	Organismes anaérobies (dépourvus de mitochondries), vivant dans le système digestif des grands mammifères herbivores.
<b>Microsporidia</b>	Plus de 1100 espèces, des parasites intracellulaires des animaux (y compris l'homme), posant de nombreux problèmes aux éleveurs.
<b>Glomeromycota</b>	Hyphes avec ébauches de cloisons, pas de reproduction sexuée, formation d'endomycorhizes vésiculo-arbusculaires.
<b>Ascomycota</b>	Hyphes septées, corps de Woronin au niveau des cloisons, présence d'une dicaryophase, production d'endospores dans des asques.
<b>Basidiomycota</b>	Hyphes septées, dolipores au niveau des cloisons, présence d'une dicaryophase, production d'exospores sur des basides.

Les champignons endomycorhiziens ont pour particularité d'être des champignons symbiotes obligatoires, c'est-à-dire incapables de survivre sans les racines de la plante hôte. Les champignons ectomycorhiziens vivent à l'extérieur au contact de la racine et forment trois structures caractéristiques : un réseau d'hyphes extra-matricielle en relation avec le sol et les fructifications du champignon, un manteau de cellules fongiques qui entoure la racine et un réseau dit « de Hartig » constitué d'hyphes qui s'allongent vers le centre de la racine entre les cellules de l'épiderme et les cellules corticales sans pénétrer les cellules (Berthelot, 2017). Les champignons endomycorhiziens apparaissent au dévonien (-462 à -353 Ma av J.C.), ils colonisent de nombreuses plantes parmi les angiospermes, les gymnospermes et les ptéridophytes. Les ectomycorhiziens apparaissent bien plus tard à l'éocène (-56 à -33 Ma av J.C.), il s'agit de champignons de la famille des *Basidiomycota* ou des *Ascomycota* qui colonisent la plupart des arbres et arbustes (Figure 10) (Brundrett, 2004).

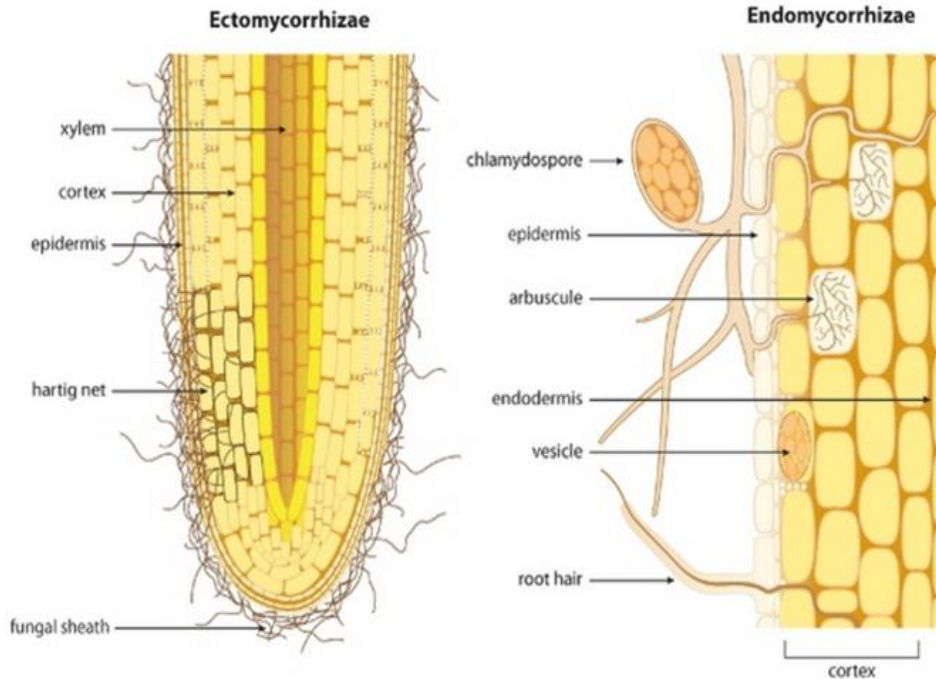


Figure 10 : Schéma illustrant les symbioses ectomycorhizienne et endomycorhizienne (Dr. Tohid Nooralvandi, 2016).

Les champignons endomycorhiziens qui forment des arbuscules sont désignés dans la littérature sous le terme « arbuscular mycorrhizal fungi » (AMF) (Cabral *et al.*, 2015). Plusieurs études montrent que les plantes sont capables d'établir des relations symbiotiques avec les champignons malgré la contamination par les ETMs (Schneider *et al.*, 2013). Des recherches montrent que les AMF confèrent aux plantes une résistance aux ETMs (Firmin *et al.*, 2015) qui pourrait être liée à des agents chélateurs ou à la fixation sur la paroi et la membrane plasmique des champignons (Sessitsch *et al.*, 2013a). Certaines études témoignent d'une amélioration de la phytoremédiation par les AMF (Sut *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016; Issn *et al.*, 2017), tandis que certaines montrent une stabilisation des ETMs dans le sol (Janoušková *et al.*, 2006).

Les endophytes racinaires sont les champignons présents dans les tissus végétaux sans causer de dégâts apparents à la plante hôte et leur rôle vis-à-vis de la croissance des plantes en milieu pollué par les ETMs est documenté depuis peu (Berthelot *et al.*, 2016). Ils demeurent entièrement dans les racines et ne sont présents dans le sol rhizosphérique que de façon transitoire, ils n'émergent que pour sporuler ou lors de la sénescence des tissus de la plante hôte. Ce groupe de champignons est principalement représenté par les endophytes bruns septés (« Dark Septate endophyte » ou DSE), les Sebacinales et les *Trichoderma*. Ils ont été étudiés sur les sites de phytomanagement et sont de bons candidats pour promouvoir la croissance des peupliers par la production de composés organiques volatiles (Berthelot *et al.*, 2016). Les DSEs appartiennent aux *Ascomycota* dont les principaux ordres sont les Helotiales, les Xylariales, les

Pleosporales, les Sordariales, les Hypocreales et les Chaetosphaeriales (Grünig *et al.*, 2011). Ce sont des champignons bruns, stériles, à hyphes septées et formant des microsclérotés dans les plantes (Figure 11). Les DSEs sont connus depuis trente ans et ont été retrouvés dans 600 plantes différentes, 320 genres et 114 familles et semblent avoir une répartition géographique étendue (Jumpponen, 2001). Les DSEs semblent être abondants dans les zones polluées aux ETMs (Regvar *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2015).

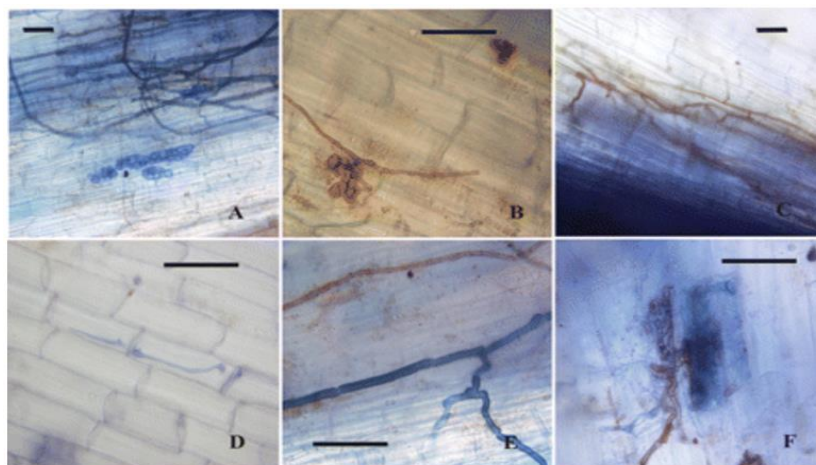


Figure 11 : DSE dans les racines du riz sauvage (montré en coupe longitudinale, échelle = 20  $\mu\text{m}$ ) : (A) colonisation d'hyphes colorées au bleu de trypan dans les cellules épidermiques avec certaines structures de type chlamyospore; (B) cooccurrence d'hyphes mélanisées et développement de structures sclérocytiques dans ou sur la couche de cortex racinaire; (C) la colonisation d'hyphes mélanisées dans l'épiderme et le cortex et les hyphes qui poussent le long de l'épiderme ou du cortex parallèlement à l'axe longitudinal des racines; (D) d'autres champignons endophytiques colorés au bleu de trypan, colonisation intracellulaire dans le cortex racinaire; (E) cooccurrence d'hyphes mélanisées et d'autres champignons endophytiques colorés au bleu; (F) initiation, développement et formation de microsclérotés. (Yuan *et al.*, 2010).

Les Sebacinales sont des *Basidiomycota* capables d'interagir avec les plantes en établissant des structures endophytiques et/ou ectomycorhiziennes. Ces champignons peuvent améliorer la résistance des plantes hôtes aux stress biotiques et abiotiques et notamment l'espèce *Piriformospora indica* (Dolatabadi *et al.*, 2011; Gill *et al.*, 2016). Les *Trichoderma* du phylum *Ascomycota* sont des endophytes à croissance rapide vivant librement dans le sol et qui sont hautement interactifs avec les racines et les feuilles. Ils colonisent souvent les racines en formant des structures comparables à des appressoriums. Ces champignons sont beaucoup étudiés puisqu'ils ont la spécificité de produire des antibiotiques et de parasiter d'autres champignons (Harman *et al.*, 2004). Le genre *Trichoderma* est l'un des plus abondants sur des sols contaminés par le Hg (Frossard, Hartmann and Frey 2017) et l'espèce *Trichoderma harzianum* en particulier montre des niveaux de résistance au Hg inhabituellement hauts (Puglisi *et al.*, 2012). De plus le genre est aussi connu pour stimuler la croissance des saules (*Salix fragilis*) et du maïs (*Zea mays*) dans des sols contaminés par du Ni et du Cd (Adams *et al.*, 2007). Il a été montré que l'espèce *Trichoderma* PDR1-7 est non seulement bénéfique pour

la croissance du pin (*Pinus sylvestris*), mais augmente également significativement l'accumulation de nombreux ETMS sur un sol enrichi en Pb et en Zn (Babu *et al.*, 2014) (Tableau 11).

**Tableau 11 : Concentration en ETMS dans les racines et les parties aériennes de *Pinus sylvestris* cultivé sur un sol contaminé en Pb par une activité minière avec et sans l'inoculation de *Trichoderma* PDR1-7 (Babu *et al.*, 2014).**

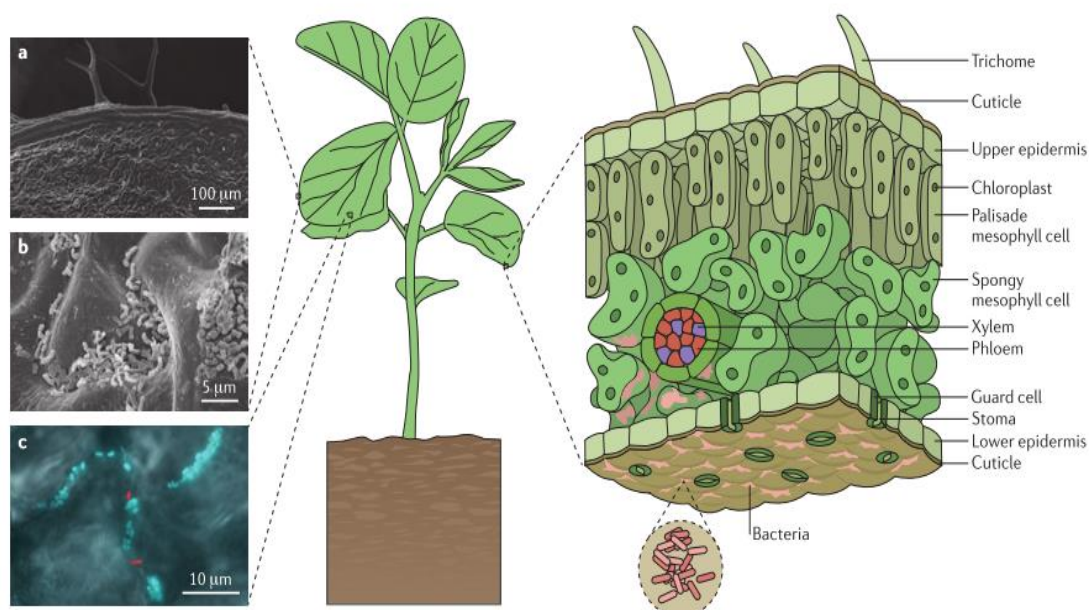
Treatments	Roots (mg kg <sup>-1</sup> )						Shoot (mg kg <sup>-1</sup> )					
	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
Uninoculated	134 ± 8	71 ± 8	242 ± 15	21 ± 4	882 ± 42	521 ± 21	97 ± 5*	19 ± 3	16 ± 9*	36 ± 4	321 ± 21	157 ± 19
PDR1-7	172 ± 13*	92 ± 12*	303 ± 19*	34 ± 2*	1174 ± 56*	655 ± 27*	62 ± 7	16 ± 2	9 ± 6	30 ± 3	432 ± 29*	228 ± 12*

An asterisk (\*) indicates a significant difference between uninoculated soil and soil inoculated with PDR1-7 (p < 0.05).

## 1.2.2 L'écosystème phyllosphérique

### 1.2.2.1 L'habitat phyllosphérique

La phyllosphère est définie *lato sensu* comme étant la partie aérienne des plantes, c'est-à-dire tous les organes hors sol qu'ils soient pérennes ou non, photosynthétiques ou non, sans préciser si le bois mort ou la litière fait partie ou non de la phyllosphère. Il est préférable de considérer la phyllosphère comme étant un ensemble d'habitats de la partie aérienne des plantes. Les organismes appartenant à la phyllosphère sont aussi bien les organismes vivant à l'extérieur (épiphytes) ou à l'intérieur (endophytes) de la partie aérienne de la plante. Cependant, l'attention des microbiologistes s'est souvent focalisée à la surface du système foliaire des plantes (phylloplan), ou leurs fruits (carposphère) et plus rarement aux tiges (caulosphère) ou aux fleurs (anthosphère) et autres organes (bractées, bourgeons, écorces) (Figure 12).



**Figure 12 : L'habitat phyllosphérique : le phylloplan (Vorholt, 2012).**

La phyllosphère est un habitat important pour les microorganismes par ses dimensions à l'échelle de la planète. En effet, la Terre est couverte de végétaux de toutes sortes et on estime la surface totale de l'ensemble des feuilles à plus d'un milliard de km<sup>2</sup> (en prenant en compte le dessus et le dessous des feuilles) si bien que les feuilles sont souvent considérées comme le poumon de la planète où de nombreux échanges gazeux ont lieu (Vorholt, 2012). Au sein de l'écosystème forestier, la phyllosphère abrite donc un ensemble d'habitats oligotrophes et les microorganismes y vivant sont adaptés à des teneurs limitantes en carbone et en azote (Figure 13).

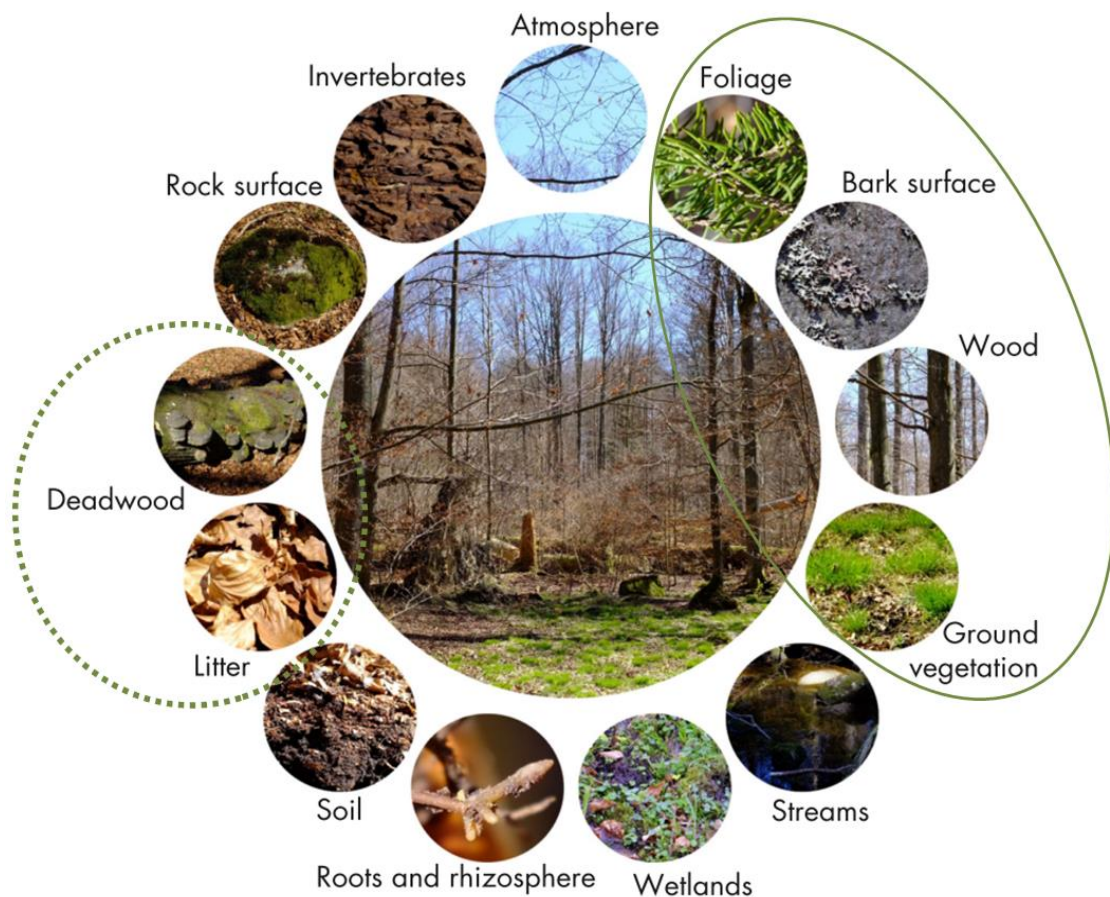


Figure 13 : Les habitats de l'écosystème forestier (Baldrian, 2017), ici, sont entourés les habitats phyllosphériques.

Ces habitats abritent de nombreuses bactéries, champignons filamenteux, levures, algues, et parfois des protozoaires et des nématodes. Sur les feuilles ce sont près de  $10^6$  à  $10^7$  bactéries qui seraient présentes par cm<sup>2</sup> soit  $10^{26}$  cellules bactériennes à l'échelle du globe (Lindow & Brandl, 2003) et 2 à 13 millions d'espèces de bactéries résideraient dans la phyllosphère (Lambais *et al.*, 2006). Les champignons filamenteux, eux, y seraient plus rares, détectables sous forme de spores transitoires, tandis que les levures y seraient plus abondantes (Lindow & Brandl, 2003). Les phylloplan et phyllosphère en général sont des milieux où les nutriments ne sont pas aussi accessibles que dans la rhizosphère puisque la plante dispose d'une

cuticule lipidique et cireuse qui limite les flux à l'interface de la plante et de l'atmosphère et qui sert de barrière contre les microorganismes. Ainsi les apports de la plante aux microorganismes épiphytes de la phyllosphère sont liés à des mécanismes comme l'excrétion, l'exsudation, la guttation, les entailles, l'infiltration ou encore la lixiviation. Ainsi, les microorganismes ont un accès limité aussi bien aux métabolites de la plante tels que les sucres solubles, les polyols, les acides aminés et les composés organiques volatiles (isoprénoides, composés halogénés, ou alcools), qu'aux sels et à l'eau provenant de la plante (Bringel & Couée, 2015).

Les facteurs qui semblent fortement corrélés à la composition des communautés de microorganismes dans la phyllosphère sont : le nombre de jours de gel dans l'année, la température moyenne en été, la pluviométrie à court et long terme (Cordier *et al.*, 2012), l'âge de l'organe végétal considéré, son état physiologique, son état structurel (endommagé ou non) (Hallmann *et al.*, 1997), la pression osmotique, la dose d'UV ou encore les apports en eau et en nutriment. Tous ces facteurs sont autant de variables qui font de la phyllosphère un habitat hostile (Kadivar & Stapleton, 2003). Au final, ce sont de nombreux facteurs, tous plus ou moins liés à la période de la journée ou de la saison, influents sur la composition et la structure de la communauté phyllosphérique. En effet, sur la durée d'une journée, les feuilles peuvent être exposées à des températures comprises entre 40 à 55 °C à la lumière du soleil, tandis que, durant la nuit, les températures à la surface chutent entre 5 et 10 °C (Thompson *et al.*, 1993). De plus, le profil des métabolites excrétés par la plante et qui sont sources de carbone pour les microorganismes varie également entre le jour et la nuit. D'ailleurs, les métabolites produits par la plante sont affectés par les stress biotiques et abiotiques qu'elle subit, ce qui fait notamment fluctuer les glucides produits (Trouvelot *et al.*, 2014). Sur un temps plus long, les changements climatiques liés aux saisons ont également un impact sur la structuration de la communauté de microorganismes. Il a par exemple été montré que la diversité et la spécificité de la communauté bactérienne du phylloplan sont maximales en milieu de saison de croissance, en juillet et août, tandis qu'elles sont plus faibles en début et fin de saison (Redford & Fierer, 2009) (Figure 14). Certaines bactéries semblent même inféodées à une période spécifique de l'année, telle que par exemple *Pseudomonas fluorescens* détectée essentiellement en hiver tandis que *Serratia marcescens* est trouvée principalement en juillet (Thompson *et al.*, 1993).

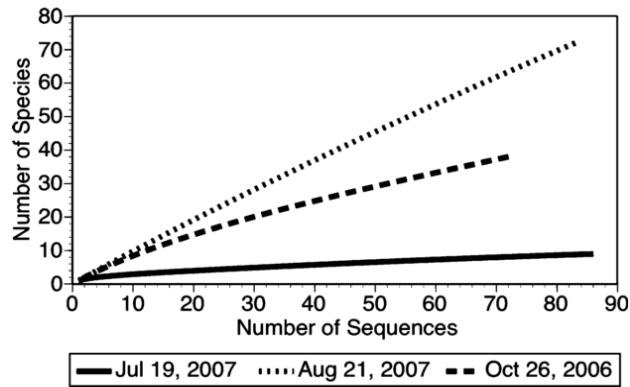


Figure 14 : Courbes de raréfactions en fonction de la saison montrant le nombre d'espèces bactériennes identifiées par séquençage 16S (799f-1492r) sur des échantillons de phylloplan (*Populus deltoides*) en fonction du nombre de séquences observées (Redford & Fierer, 2009).

### 1.2.2.2 Les microorganismes de la phyllosphère

La phyllosphère est donc un milieu hautement sélectif pour les microorganismes du fait de la grande variabilité des stress auxquels ils sont soumis. Au final, tout comme pour la rhizosphère, et peut-être à un degré encore supérieur, la communauté des microorganismes phyllosphérique doit nécessairement être hautement adaptée à ce milieu. L'ensemble de ces adaptations (Figure 15) à l'habitat ne sont pas anodines, elles ont un coût énergétique pour l'organisme qui n'est pas négligeable, il doit nécessairement en résulter des avantages sélectifs significatifs pour la cellule sous peine de diminuer drastiquement son fitness (propension d'un organisme à perpétuer son organisation génétique au travers de sa descendance, on parle aussi de valeur sélective en français).

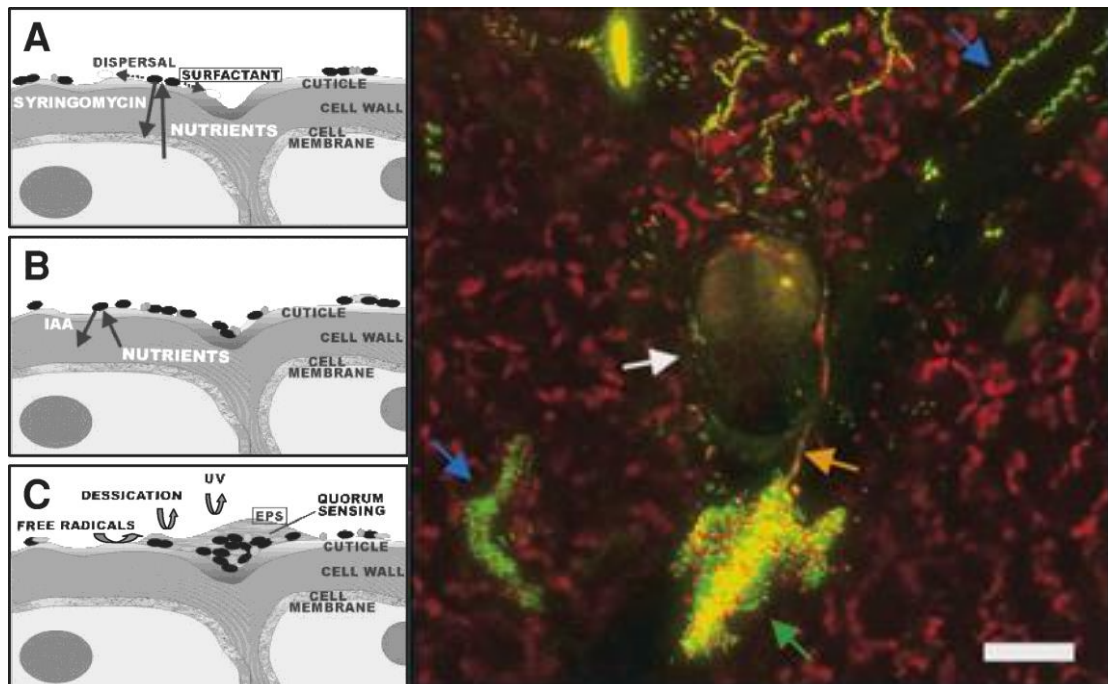
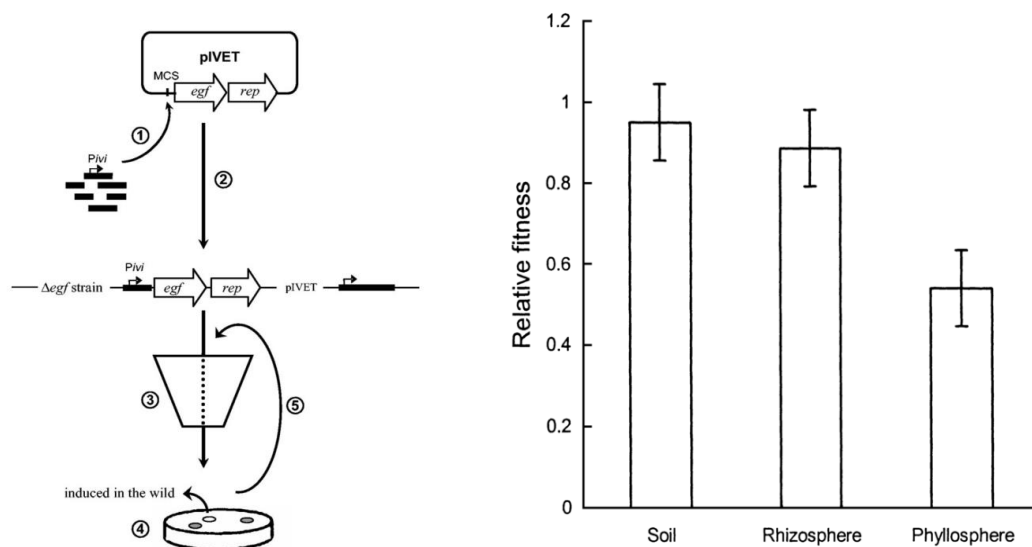


Figure 15 : Interactions entre microorganismes et le phylloplan (à gauche) et microscopie par fluorescence du phylloplan révélant par les flèches bleues des bactéries aux jonctions cellulaires, par la flèche blanche la base d'un trichome glandulaire, par la flèche orange une hyphes fongique et par la flèche verte un agglomérat de bactéries à la base du trichome (Lindow & Brandl, 2003).



Pourtant, bien que le sol, la rhizosphère et la phyllosphère soient des habitats très différents, certains organismes notamment appartenant au genre *Pseudomonas* sont ubiquitaires et se retrouvent dans ces trois habitats très distincts. Il a été montré que chez la bactérie *Pseudomonas fluorescens* des gènes impliqués dans l'acquisition de nutriments, pour la réponse aux stress et pour la sécrétion sont indispensables pour le maintien du fitness de la bactérie dans la rhizosphère, et surtout dans la phyllosphère. Ces gènes ne sont que peu exprimés lorsque la bactérie se trouve dans le sol (Gal *et al.*, 2003), il s'agirait donc de « gènes d'adaptabilité » à la rhizosphère et à la phyllosphère, dont l'expression est contrôlée par des mécanismes qui sembleraient être habitat-dépendant. En détails, l'auteur s'est basé sur des travaux précédents qui ont montré que sur une vaste librairie mutant de *P. fluorescens* SBW25 (bactéries gram-associées aux plantes), 20 gènes seraient induits par l'habitat rhizosphérique (gènes *rhi*) (Rainey, 1999). En utilisant une stratégie « promoter trapping » (IVET) (Rediers *et al.*, 2005) l'auteur a identifié 25 gènes *rhi* exprimés par la bactérie dans la rhizosphère de canne à sucre. Un opéron en particulier *wss*, codant pour un acétate de cellulose, serait impliqué à la fois pour l'acquisition de nutriment, pour la réponse au stress, et pour la biosynthèse de phytohormones et d'antibiotiques. Ce dernier s'est avéré essentiel pour le maintien du fitness de la bactérie dans la rhizosphère et la phyllosphère et non dans le sol (Figure 16).



**Figure 16 :** (A gauche) Représentation schématique de la technique IVET. La technique implique une souche mutée pour un gène essentiel pour la croissance (*egf*) et un second élément à savoir le “promoter trap”. C’est un plasmide avec une cassette *egf* sans promoteur (*P<sub>ivi</sub>*) et un gène rapporteur (*rep*). L’ADN bactérien est cloné aléatoirement dans le “promoter trap” (étape 1) puis intégré dans le chromosome de la souche mutante *egf* (étape 2). Seul l’ADN environnementale qui porte le promoteur induisant *egf* va compenser la mutation et permettre la croissance de la bactérie (étape 3). La suspension bactérienne est alors étalée sur un milieu gélosé de culture *in vitro* qui permet de révéler le gène rapporteur ce qui permet de distinguer les bactéries porteuses d’un promoteur induit dans l’environnement des promoteurs “constitutif” (étape4). Une seconde IVET permet d’éviter les faux positifs. (A droite) Diagramme de la fitness relative de *P. fluorescens* SBW25 muté sur l’opéron *wss* en fonction de l’habitat. L’erreur standard est représentée. (Gal *et al.*, 2003; Rediers *et al.*, 2005).

Les microorganismes de la phyllosphère vivent dans un milieu oligotrophe et sont donc très dépendants de leur capacité à exploiter les ressources en carbone (C) et en azote (N) fournies par la plante au travers de sa cuticule relativement imperméable aux échanges biochimiques. Il a été montré qu'un changement dans la composition de la cuticule d'*Arabidopsis thaliana* impliquait des changements significatifs de la composition de la communauté des microorganismes vivant sur les feuilles (Reisberg *et al.*, 2013). La production des surfactants permettant l'humidification de la cuticule et facilitant l'accès aux nutriments est une des adaptations retrouvées chez les microorganismes de la phyllosphère. Parmi les microorganismes les plus présents sur la phyllosphère se trouvent des bactéries du genre *Sphingomonas* capables d'utiliser un panel de très nombreux glucides et les genres *Methylobacterium* capables d'utiliser le méthanol comme source de carbone et d'énergie (Delmotte *et al.*, 2009).

D'autres bactéries semblent adaptées à ce milieu spécifique, comme les *Flavobacteria* qui existent aussi bien dans les environnements terrestres et aquatiques, mais seules celles trouvées sur la phyllosphère disposent de gènes codant pour la glycoside hydrolase qui permet l'utilisation du rhamnogalacturonan (associé à l'hémicellulose) comme source de carbone (Kolton *et al.*, 2013). Certains microorganismes pourraient aussi augmenter la perméabilité de la feuille par la sécrétion à faible dose de syringomycine qui entraînerait des nécroses sans entraîner de maladie et la création de pores (Whipps *et al.*, 2008). Dans cet habitat oligotrophique très exposé à la lumière du soleil, les microorganismes qui pourraient utiliser la lumière comme ressource de carbone et d'énergie bénéficieraient d'un avantage certain. Bien que ce genre de microorganismes n'ait pas été clairement identifié, la présence de rhodopsine bactérienne (pigment protéique photosensible) a été détectée dans la communauté de la phyllosphère de plusieurs plantes (Atamna-ismaeel *et al.*, 2013). La rhodopsine bactérienne de cet habitat impliquerait qu'une partie de la communauté bactérienne serait phototrophe. De plus, ces rhodopsines n'interceptent pas les mêmes longueurs d'ondes que la chlorophylle, il n'y aurait donc pas concurrence entre la plante hôte et les microorganismes phototrophes que la plante abrite. L'adaptation aux ultraviolets (UV) est également une caractéristique spécifique de la phyllosphère, on retrouve ainsi de nombreux microorganismes protégés par des pigments, souvent roses ou orangés, à la surface de la feuille. En outre, des bactéries comme les *Pseudomonas syringae* sont un exemple de bactéries résistantes aux UV par des mécanismes génétiques. En effet, grâce au plasmide UV inductible *ruLAB* permettant les réparations de l'ADN, ces bactéries ont une résistance importante aux UV (Lindow & Brandl, 2003). Une autre caractéristique spécifique de la phyllosphère est la propension des bactéries à former des

agglomérats par l'intermédiaire de production d'exopolysaccharides (EPS) et de communication cellulaire via le « quorum sensing ». Les agglomérats se trouvent notamment près des sources de nutriments telles que les trichomes glandulaires sur la surface foliaire. Ceci pourrait conférer à l'agglomérat bactérien des résistances accrues aux différents stress UV, bactéricides, prédation ainsi que variation de pH.

Les chercheurs ont également questionné les interactions entre plantes-hôtes et microorganismes : (i) comment varie la communauté de la phyllosphère en fonction de la variabilité intra spécifique selon des distances géographiques de 10 m à 10 km et la variabilité interspécifique sur un même site ? ; (ii) quels sont les liens entre l'espèce de la plante-hôte et la communauté de la phyllosphère ? ; (iii) peut-on prédire la communauté de la phyllosphère selon la plante hôte ? La recherche a montré qu'il y a un degré élevé de variabilité de la phyllosphère d'une espèce de plante-hôte à l'autre, tandis qu'il y a une forte corrélation entre la communauté de la phyllosphère et l'espèce-hôte (Redford *et al.*, 2011). Une récente étude tend d'ailleurs à démontrer que les arbres de forêts tempérées partagent tous une portion importante de leur communauté bactérienne (un large coregénom) ; elle avance que la composition de la communauté phyllosphérique est expliquée à 27 % par l'espèce d'arbre (5 arbres testés), à 14 % par l'interaction entre l'espèce et le site, à 11% par le site (3 sites de forêts tempérées) et à 1% par la saison (Juillet puis Août) de croissance des feuilles (Laforest-Lapointe *et al.*, 2016) (Figure 17).

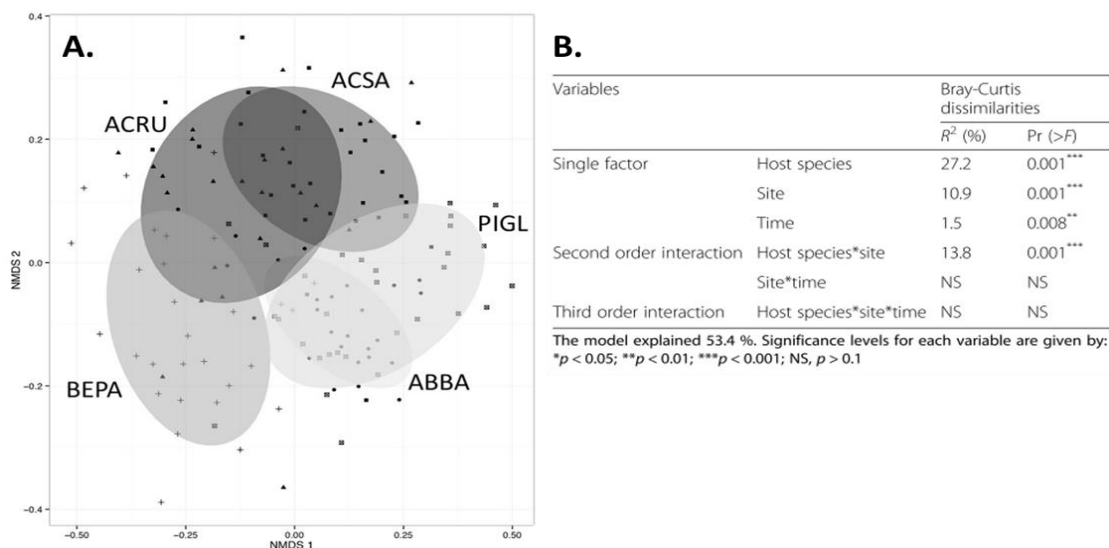
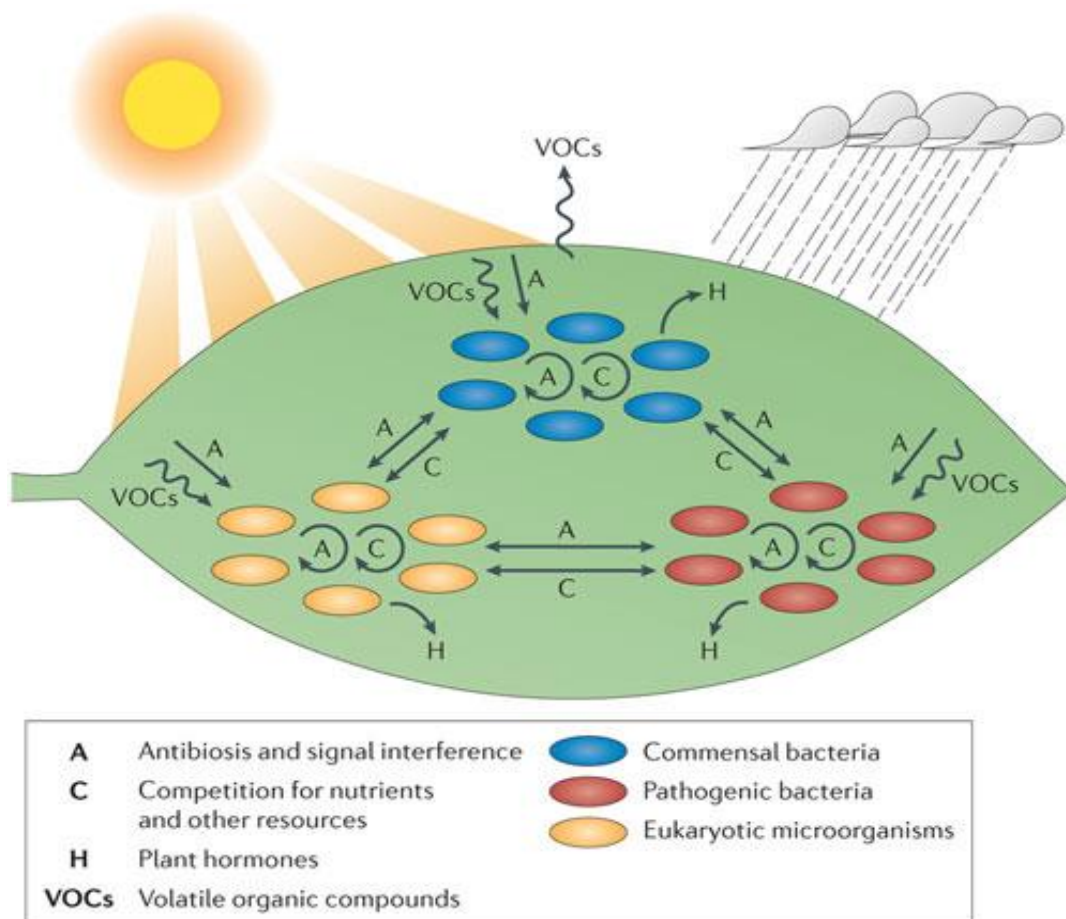


Figure 17 : (A.) « Non-metric multidimensional scaling » (NMDS) présentant la variation des communautés bactériennes phyllosphériques associées à *Abies balsamea* (ABBA), *Acer rubrum* (ACRU), *Acer saccharum* (ACSA), *Betula papyrifera* (BEPA) et *Picea glauca* (PIGL) détectées par séquençage Illumina de la région 16S bactérienne (799f-1115r). Notons que deux temps ont été pris en compte (juillet et août) et trois sites de forêts tempérées. Les ellipses représentent les intervalles de confiance pour chaque espèce. (B.) « Permutational analysis of variance » (PERMANOVA) présentant les facteurs explicatifs de la variation de la structure de la communauté bactérienne (Laforest-Lapointe *et al.*, 2016).

Cependant, pour d'autres plantes comme le haricot, le soja ou le canola, la communauté phyllosphérique évolue rapidement durant la saison. En début de saison, la communauté phyllosphérique est influencée par la communauté très diversifiée du sol, puis des taxons, plantes spécifiques, deviennent dominants (Copeland *et al.*, 2015). Des interdépendances fortes entre microorganismes et plantes-hôtes semblent donc s'être développées lors de leur cohabitation. Ces interactions peuvent s'expliquer notamment par la variation en composition et en quantité des nutriments disponibles en fonction de l'espèce des plantes hôtes particulièrement pour les glucides, les acides organiques et les acides aminés. Ainsi, un micro-écosystème se crée au niveau de la phyllosphère à l'instar de la rhizosphère et des interactions microbes-microbes, plantes-microbes et microbes-plantes s'établissent et se stabilisent (Figure 18).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 18 : Les interactions de la plante et des microorganismes dans la phyllosphère (Vorholt, 2012).

Dans le microbiome de la phyllosphère, il existe des organismes pathogènes tout comme dans la rhizosphère, mais la distinction entre organismes commensaux et mutualistes est moins facilement actée par les scientifiques. Pourtant, certains microorganismes de la phyllosphère

produisent des effets de promotion de la croissance des plantes, directs ou indirects, que nous détaillerons dans la prochaine partie. Notons par exemple que de nombreuses bactéries produisent des hormones de croissances telles que les auxines ou les cytokinines, que certains organismes produisent des antibiotiques et que la prolifération par des microorganismes commensaux diminue la colonisation des fleurs et des fruits par des organismes pathogènes participant activement à l'immunité de la plante (Lindow & Brandl, 2003; Vorholt, 2012; Maignien *et al.*, 2014; Trouvelot *et al.*, 2014; Bringel & Couée, 2015). Il est même avancé que les microorganismes des plantes pourraient protéger les feuilles de certains UV et les protéger des herbivores et autres phytophages en produisant des métabolites secondaires (Vacher *et al.*, 2016). Certains groupes d'organismes ont été spécifiquement définis comme PGPB de la phyllosphère par exemple les genres : *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Nostoc*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Scytonema*, *Sphingomonas* et *Stigonema* (Figure 19) (Lindow & Brandl, 2003; Glick, 2014; Vacher *et al.*, 2016).

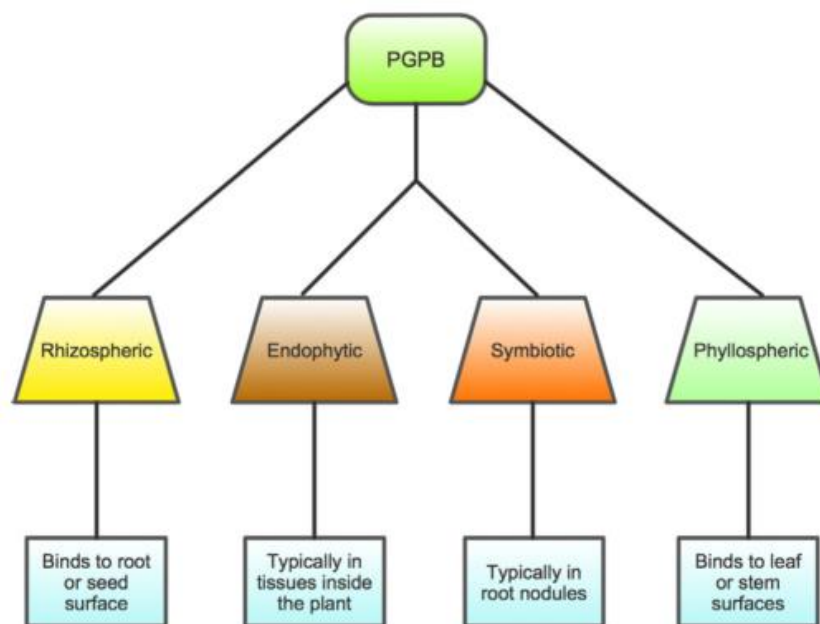


Figure 19 : Les quatre grandes classes de PGPB selon Glick (2014).

Par ailleurs, la phyllosphère en tant qu'interface entre la plante et l'atmosphère pour les plantes terrestres, est le lieu d'échanges des gaz pour le fonctionnement de la machinerie cellulaire et pour la communication de la plante avec son environnement. De plus, les parties aériennes de la plante sont exposées à des stress bien différents des parties racinaires. De ce fait, les plantes émettent des composés organiques volatiles (« volatil organic compounds » ou VOCs) qui assurent notamment la défense des plantes contre les herbivores (signaux répulsifs) et leur reproduction via les pollinisateurs (signaux attractifs), mais aussi la communication avec

les autres plantes, la régulation de la croissance, des régulations liées au climat et la régulation de tous types de stress biotiques et abiotiques. Si les plantes sont les premiers producteurs de VOCs dans la biosphère, ces composés peuvent également être des polluants d'origine anthropique. Les chercheurs ont montré que la composition et la structure de la communauté des microorganismes du phylloplan étaient influencées par ses VOCs, mais aussi que les microorganismes jouaient un rôle important pour la dégradation et la régulation de ces VOCs (Bringel & Couée, 2015).

Parmi les VOCs émis par la plante se trouvent de nombreuses phytohormones impliquées dans la régulation de nombreux phénomènes. Par exemple, l'éthylène, dont une étude sur *Arabidopsis thaliana* a montré qu'il influençait la composition de la communauté de microorganismes (Bodenhausen *et al.*, 2014). Un autre facteur qui est fortement corrélé à la structure de la communauté microbienne est le niveau de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère bien qu'il puisse s'agir d'effets indirects sur la croissance. D'autre part, les microorganismes de la phyllosphère contribuent à la dégradation de polluants organiques présents dans l'atmosphère comme les phénols (Sandhu *et al.*, 2009), les HAPs (Yutthammo *et al.*, 2010), ou encore le chlorométhane (Nakamiya *et al.*, 2009). Le genre *Arthrobacter* notamment est connu pour se développer sur la phyllosphère et dégrader de nombreux VOCs (Scheublin & Leveau, 2013). Parmi les VOCs émis, certains sont sources de carbone voire d'azote pour les microorganismes opportunistes du phylloplan. Les microorganismes méthylotrophes sont les plus connus tels que *Methylobacterium extorquens* et la levure *Candida boidinii* qui se trouvent sur le phylloplan et consomment le méthanol (CH<sub>3</sub>OH) comme source de carbone (Sy *et al.*, 2005; Kawaguchi *et al.*, 2011). D'autres sources de carbone sont interceptées par les microorganismes du phylloplan, comme le méthane (CH<sub>4</sub>), par des bactéries des genres *Methylomonas*, *Methylosinus*, et *Methylocystis* (Iguchi *et al.*, 2012), l'isoprène (2-méthyl-1,3-butadiène), par des bactéries du genre *Rhodococcus* (van Hylckama Vlieg *et al.*, 2000) et le chlorométhane (CH<sub>3</sub>Cl), par des bactéries du genre *Hyphomicrobium* dégradant aussi le méthanol (Nadalig *et al.*, 2011). L'utilisation de ces différents composés par les microorganismes conduit à une diminution drastique des émissions de ces composés depuis la plante vers l'atmosphère. Par exemple, les doses de méthanol émises par *Nicotiana* sont de l'ordre de 0.4 – 0.7 ppbv (« part per billion volatil ») en l'absence de *M. extorquens* alors qu'en présence de la bactérie, les émissions sont réduites à 0.005 - 0.01 ppbv (Abanda-Nkpwatt *et al.*, 2006).

Les perspectives d'un impact important des microorganismes de la phyllosphère sur la composition chimique de l'atmosphère, aussi bien par l'interaction avec les VOCs produits par

les végétaux que ceux d'origines anthropiques, font de cet habitat négligé par la recherche un sujet préférentiel pour de futures études (Figure 20).

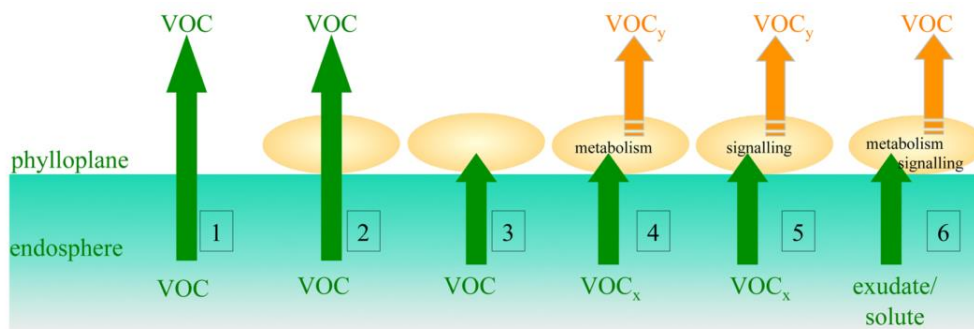


Figure 20 : Les hypothèses lors de l'émission de VOCs par la plante au niveau du phylloplan :

- 1) émission directe vers l'atmosphère à travers la cuticule ;
- 2) émission directe vers l'atmosphère à travers la cuticule et les microorganismes ;
- 3) interception par les microorganismes via des mécanismes abiotiques ou métaboliques ;
- 4) interception et biotransformation des VOCx de la plante et émission de VOCy par les microorganismes ;
- 5) interception des VOCx de la plante qui sont des signaux pour l'activation d'un système chez le microorganisme qui résulte par l'émission de VOCy par les microorganismes ;
- 6) interception de molécules signales émises par la plante qui résulte par l'émission de VOCy par les microorganismes (Bringel & Couée, 2015).

### 1.2.3 L'influence des microorganismes sur la plante-hôte

Le rôle essentiel des microorganismes dans le contexte de phytomanagement consiste à améliorer l'implantation, la croissance et la santé des plantes. Dans une moindre mesure ils peuvent également jouer sur la biodisponibilité des ETMs du sol (Figure 21).

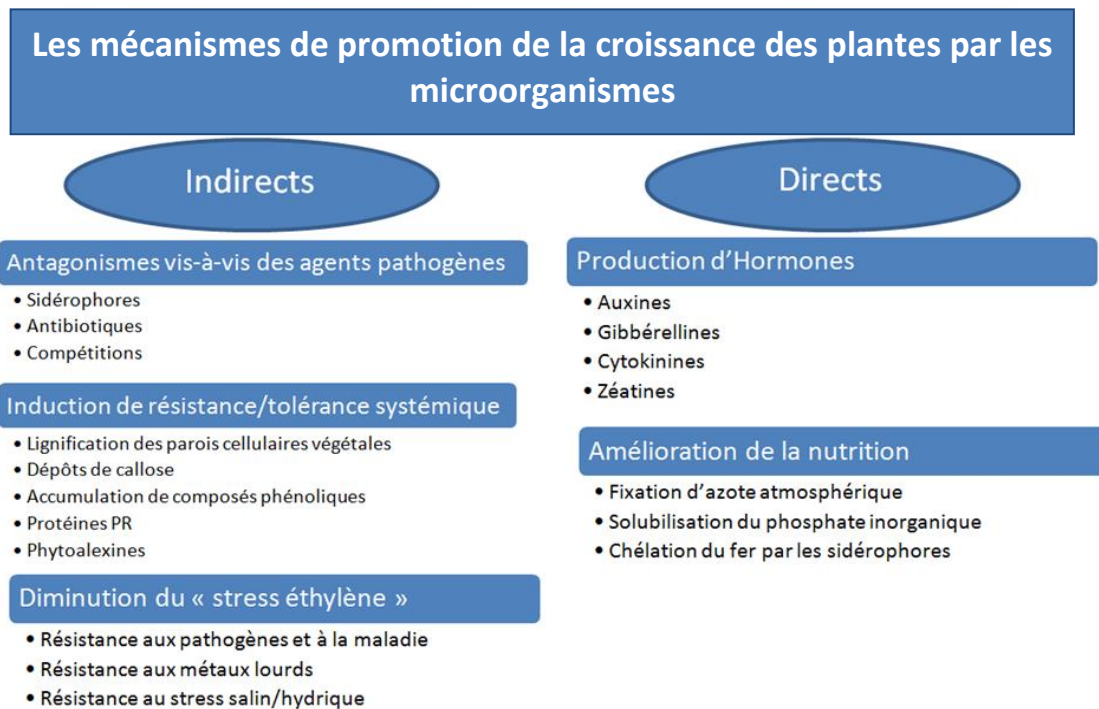


Figure 21 : Les mécanismes de promotion de la croissance des plantes par les microorganismes.

### 1.2.3.1 Antagonismes vis-à-vis des agents pathogènes (action PGP indirecte)

Le sol abrite des agents pathogènes racinaires. Ce sont des organismes appartenant à différents phylums : des bactéries, des champignons et des nématodes, mais aussi des virus. Il s'agit d'organismes, qui, bien souvent, pénètrent dans les tissus racinaires pour y résider jusqu'à la mort de la plante ou bien s'en échappent pour contaminer d'autres tissus (Haas et Défago, 2005). Ils sont à l'origine de maladies diminuant la croissance des plantes voire causant leur mort. La phyllosphère, quant à elle, est souvent exposée à des microorganismes pathogènes transportés par le vent, les précipitations ou les animaux et qui peuvent pénétrer dans la plante par les lésions sur les feuilles, les tiges ou l'écorce. Les organismes PGP, *via* la production d'antibiotiques et de sidérophores, sont capables de rentrer en compétition avec ces organismes néfastes pour la plante et sont ainsi qualifiés d'agents de « biocontrôle » (Loon & Bakker, 2006; Nihorimbere & Ongena, 2017). Parmi les composés antibiotiques, de nombreux travaux ont concerné le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG) (Almario *et al.*, 2017), les phénazines (Yang *et al.*, 2017) et les pyrroles (Beneduzi *et al.*, 2012).

Le terme sidérophore est construit à partir de deux mots d'origine grecque : "*sidero*", qui signifie "fer" et "*-phore*", qui signifie "qui porte". Ce sont des molécules qui ont un rôle de transporteur du fer. Ces molécules, de faible poids moléculaire, sont synthétisées et sécrétées par les microorganismes uniquement lorsque la concentration en fer dans le milieu est faible (Figure 22).

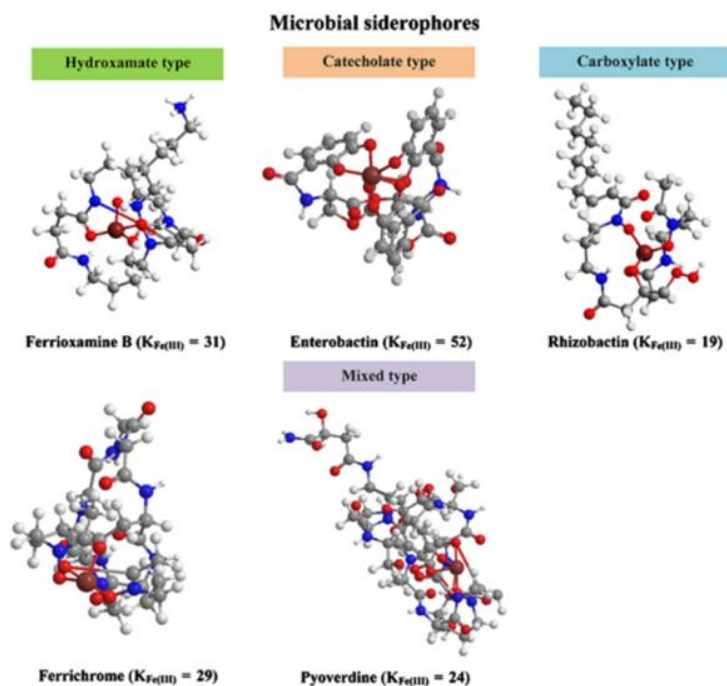


Figure 22 : Structures et constantes d'affinités avec le fer III -  $K_{Fe(III)}$  - de sidérophores microbiens (Ahmed, 2014).



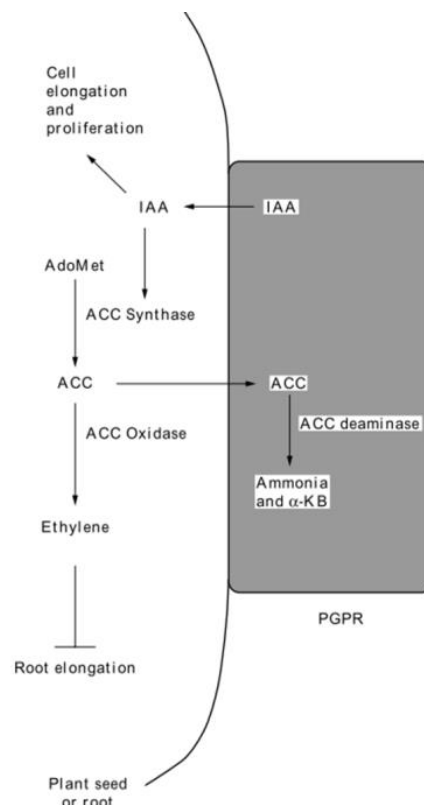
Les sidérophores ont une forte spécificité de liaison et une forte affinité pour le fer (III) (ion ferreux  $Fe^{3+}$ ) et une relativement faible affinité pour le fer (II) (ion ferrique  $Fe^{2+}$ ) (Ahmed et Holmström, 2014). De plus, ils sont solubles dans l'eau et facilitent ainsi la solubilisation du fer (III) et son transport à l'intérieur des cellules. Le système d'acquisition du fer *via* les sidérophores met en jeu un système de transport actif (Castignetti et Smarrelli, 1986). Concernant le mode d'action des sidérophores, le complexe formé par les sidérophores bactériens et le fer (III) présente une constante de stabilité élevée (Ahmed et Holmström 2014), de l'ordre de  $10^{32}$ . Il en existe une grande variété et près de 500 types ont été identifiés (Sessitsch *et al.*, 2013). Les sidérophores fongiques ont une constante de stabilité de l'ordre de  $10^{29}$ . Ainsi, les complexes formés par les sidérophores bactériens sont plus efficaces et en chélatant le fer du milieu de façon plus forte, les bactéries PGPR privent ainsi les autres microorganismes de la rhizosphère et de la phyllosphère de cet élément essentiel, ce qui inhibe leur développement (Lemanceau *et al.*, 1993). Plus généralement, les microorganismes qui produisent des sidérophores ont un impact sur les équilibres au sein de la plante pour ce qui concerne l'homéostasie du fer, la fonction immunitaire et la croissance (Trapet *et al.*, 2016).

#### **1.2.3.2 L'induction de résistance systémique (action PGP indirecte)**

Un autre mécanisme développé par les bactéries promotrices de croissance est l'induction d'une résistance systémique chez les végétaux, phénomène connu sous le terme résistance systémique induite (ISR) (Loon et Bakker, 2006). En effet, l'inoculation de semences par certaines bactéries d'intérêt agronomique se traduit par des modifications structurales des parois végétales : lignification des parois cellulaires végétales, dépôts de callose, accumulation de composés phénoliques (Ward *et al.*, 1991; Conrath *et al.*, 2015). L'inoculation de plantes par une bactérie PGPB peut aussi entraîner des changements physiologiques et biochimiques qui aboutissent à la synthèse de protéines et à la production de substances chimiques impliquées dans les mécanismes de défense des plantes : accumulation de protéines PR pour « Pathogenesis Related » (représentent un ensemble de protéines produites par les végétaux dont la production est fortement induite lors de l'infection)., synthèse de phytoalexines, production accrue d'enzymes lytiques (Pieterse *et al.*, 2014). L'induction d'une résistance systémique a été montrée depuis longtemps, aussi bien pour lutter efficacement contre des champignons affectant les racines des plantes que les parties aériennes (Peer *et al.*, 1991 ; Leeman *et al.*, 1995). Ces mécanismes sont également impliqués dans la lutte contre diverses bactérioses et viroses (Maurhofer *et al.*, 1994 ; Boro *et al.*, 2011).

### 1.2.3.3 Diminution du stress éthylène (action PGP indirecte)

L'éthylène est une phytohormone régulatrice de croissance. C'est une molécule organique simple qui intervient lors de la plupart des stades de développement de la plante. Sa concentration dans la plante est à un niveau basal faible ( $0,05 \mu\text{l.l}^{-1}$ ) durant la majeure partie de sa vie, mais augmente ( $10$  à  $100 \mu\text{l.l}^{-1}$ ) lors de la sénescence des feuilles et la maturation des fruits (Abeles *et al.*, 1992). Par ailleurs, cette phytohormone est régulée par de nombreux facteurs tels que la température, la lumière, la gravité, la nutrition et d'autres hormones végétales (Glick, 2005). Le stress éthylène, quant à lui, est défini comme l'accélération de la biosynthèse d'éthylène liée soit à un stress biotique (présence d'un agent pathogène), soit abiotique (métaux lourds, stress salin/hydrique) (Chang *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2016). Une augmentation de la concentration en éthylène inhibe l'élongation racinaire et celle des parties aériennes du végétal au profit de l'élongation de petites racines latérales (Madhaiyan *et al.*, 2006). Glick *et al.* (1997) proposent un modèle (Figure 23) montrant comment une bactérie PGPR, *via* la production d'une enzyme (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase ; *ie.* ACCd), peut entraîner la diminution de la synthèse d'éthylène chez la plante colonisée.



**Figure 23 : Association plante - PGPR, modèle menant à la diminution de la production d'éthylène  $\alpha$ -KB :  $\alpha$ -Kétobutyrate, ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate, AdoMet : S-adenosyl-méthionine IAA : l'acide indole-3-acétique, PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Glick *et al.*, 1997).**

Une fraction de l'ACC est exsudée par la plante et hydrolysée par la PGPR pour produire des composés carbonés et azotés. Le prélèvement et l'hydrolyse par la bactérie impliquent une

diminution de la concentration de l'ACC hors de la plante et, pour maintenir l'équilibre entre les tissus végétaux et l'extérieur, la plante exsude davantage d'ACC dans la rhizosphère. Cette exsudation accrue d'ACC favorise la croissance des bactéries, dans la mesure où l'ACC constitue une source d'N et de carbone, ce qui, au final, entraîne une diminution de la synthèse d'éthylène et ainsi une meilleure croissance de la plante (Safronova *et al.*, 2005; Reed *et al.*, 2005).

#### **1.2.3.4 La production d'hormones (action PGP directe)**

La synthèse de substances ayant un rôle dans la régulation de la croissance des plantes est observée chez de nombreux microorganismes tels que les auxines dont l'acide indole-3-acétique (AIA), les gibbérellines dont l'acide gibbérellique, les cytokinines dont la zéatine et l'éthylène. L'AIA est la plus répandue des auxines dans la plante, il s'agit d'une phytohormone qui intervient à différents niveaux dans le développement de la plante. L'AIA est synthétisée de façon continue au niveau des méristèmes des parties aériennes et migre vers les racines. A ce niveau, la concentration s'élève progressivement au cours de la vie de la plante. Les effets de l'AIA sont liés à sa concentration et ils vont être variables. Une concentration faible (équivalente à  $10^{-8}$  g.ml<sup>-1</sup>) provoque une stimulation de l'élongation racinaire ; des concentrations plus élevées (équivalentes à  $10^{-7}$  à  $10^{-5}$ .ml<sup>-1</sup>) entraînent une stimulation encore plus importante de la rhizogenèse. Dans les racines âgées, la teneur en AIA devient supra-optimale et inhibe la croissance racinaire (Rajkumar *et al.*, 2012). En plus des sécrétions de la plante, les microorganismes associés à celle-ci produisent également de l'AIA. Plusieurs voies de synthèse de l'AIA ont été identifiées chez les microorganismes, elles sont variables selon les souches bactériennes étudiées et une souche donnée peut posséder une ou plusieurs voies. Dans tous les cas, la biosynthèse débute par le tryptophane, un acide aminé (Patten et Glick, 1996). Les microorganismes producteurs d'AIA sont répandus aussi bien dans la rhizosphère que dans la phyllosphère, partout où du tryptophane est excrété par la plante. Ce composé se retrouve dans les rhizodépôts de certaines plantes (Dakora et Phillips, 2002 ; Dennis *et al.*, 2010). Ainsi, les PGPR seront capables de produire de l'AIA en réponse au tryptophane libéré par les plantes (Xie *et al.*, 1996 ; Saharan et Nehra, 2011) et la quantité d'AIA produite dépendra de la quantité de tryptophane libérée par les plantes (Dimkpa *et al.*, 2008). Par ce mécanisme, les PGPR entraînent une augmentation de la biomasse des plantes. En outre, il est possible d'observer une augmentation de la surface racinaire ainsi qu'une augmentation de la longueur racinaire totale due principalement au développement important des racines latérales. Il en résulte une meilleure alimentation de la plante, se traduisant par l'augmentation de la concentration en

potassium, phosphore et nitrate dans celle-ci (Etesami *et al.*, 2009). Une étude récente montre que des bactéries endophytes productrices d'AIA améliorent la fixation d'N par le riz (Defez *et al.*, 2017). Enfin, il a été établi que l'impact de la production d'auxines par les PGPR est d'autant plus significatif lorsque la plante n'est pas en conditions optimales de croissance (Yang *et al.*, 2009 ; Azcón *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2011). Des travaux récents mettent en avant ce phénomène en comparant l'efficacité de l'inoculation en termes de promotion de croissance de plantes de deux PGPB dans des conditions de stress hydrique et/ou métallique (Figure 24) (Ma *et al.*, 2016).

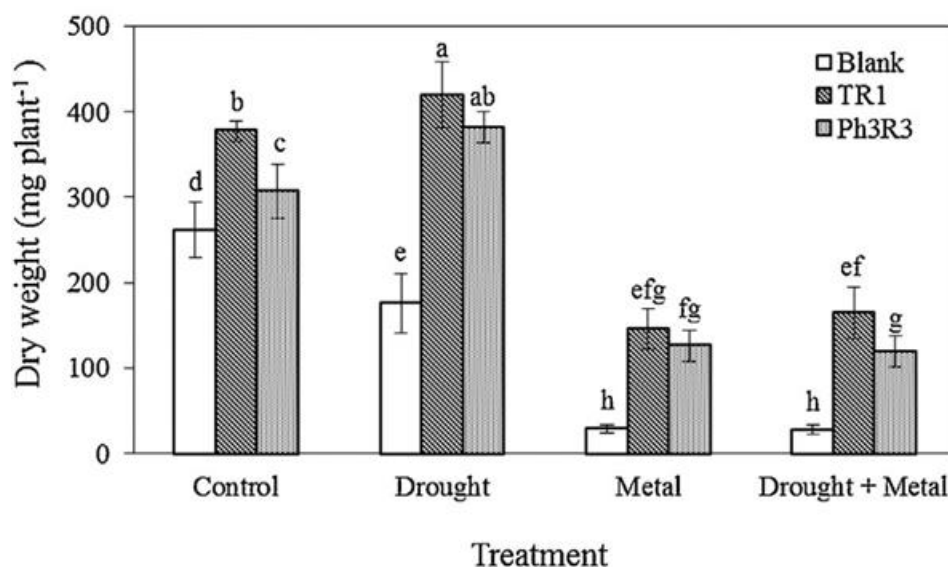


Figure 24 : Effets de l'inoculation de *Pseudomonas libanensis* TR1 (TR1) et de *Pseudomonas reactans* Ph3R3 (Ph3R3) ou sans inoculation (Blank) sur la masse sèche de *Brassica oxyrrhina* en fonction de quatre traitements : i) optimal de croissance soit un arrosage fixé à 100 % de la capacité de rétention en eau du sol et non enrichi en Zn et Cu (Control), ii) 50 % de la capacité de rétention en eau du sol et non enrichi en Zn et Cu (Drought), iii) 100 % de la capacité de rétention en eau du sol et un sol enrichi en Cu (400 mg.kg<sup>-1</sup>) et en Zn (500 mg.kg<sup>-1</sup>) (Metal), et iv) ii + iii (Drought + Metal) (Ma *et al.*, 2016).

Le tryptophane est également sécrété au niveau de la phyllosphère et de nombreux organismes épiphytes (bactéries et levures) sont connus pour leur production d'AIA (Rivas *et al.*, 2005; Limtong & Koowadjanakul, 2012; Sun *et al.*, 2014a). A l'instar de l'éthylène, l'AIA a des effets différents sur la plante en fonction de sa concentration. La production d'AIA à faible concentration va entraîner un relâchement de la paroi cellulaire (Vanderhoef & Dute, 1981), et lorsque l'AIA provient des microorganismes, il va entraîner la stimulation des excréctions de saccharides par la plante en activant des enzymes de clivage de la cellulose et de l'hémicellulose chez les plantes monocotylédones et dicotylédones (Fry, 1989). La prolifération cellulaire permettrait alors la colonisation de la phyllosphère par des bactéries impliquées dans le biocontrôle. Le phénomène de production d'AIA par les bactéries épiphytes reste peu connu. La littérature scientifique propose que la production d'AIA crée un microenvironnement favorable pour le développement des bactéries épiphytes, cependant il reste à déterminer à quel

point la production d'AIA influence la colonisation et/ou la survie de la bactérie sur la plante. Par ailleurs, la production d'AIA en trop grande quantité pourrait également entraîner la sous-expression des gènes de réponses au stress ou encore la diminution de la sensibilité de la plante, ce qui pourrait favoriser des bactéries pathogènes ou même être une stratégie des organismes pathogènes (Brandl & Lindow, 1998).

#### **1.2.3.5 L'amélioration de la nutrition (action PGP directe)**

L'N est un des principaux nutriments des plantes et certains microorganismes sont capables de participer à la fixation du diazote ( $N_2$ ) atmosphérique comme par exemple les bactéries du genre *Frankia* qui forment des nodosités au niveau racinaire (Zhang *et al.*, 1996). Un grand nombre de bactéries fixatrices d'N vivant sur le phylloplan a déjà été rapporté par le passé pour diverses plantes de forêt tropicale (Murty, 1984), de forêt continentale (Ruinen, 1961) ou des cultures (Pati & Chandra, 1981; Pati, 1992). En outre, le P est le deuxième nutriment minéral le plus limitant pour les plantes après l'N et sa disponibilité est faible pour les plantes dans la plupart des conditions de culture (Sharma et Johri, 2003). Certaines bactéries pourraient agir sur les P organiques et les P inorganiques selon deux mécanismes (Kucey *et al.*, 1989 ; Rodríguez et Fraga, 1999) : i) la minéralisation des P organiques et leur solubilisation suite à l'action de phosphatases, ii) la solubilisation des P inorganiques insolubles par la production d'acides. Fe, quant à lui, a un rôle déterminant dans les réactions enzymatiques et la production d'enzymes végétales et bactériennes. C'est un élément indispensable pour tous les organismes vivants (O'Sullivan & O'Gara 1992 ; Saharan et Nehra, 2011). C'est un nutriment essentiel pour les plantes, mais il est très faiblement soluble dans le sol et donc peu disponible (Matzanke 1991 dans Hussein et Joo, 2014). En effet, la quantité de Fe nécessaire pour le fonctionnement de la machinerie cellulaire d'un organisme s'exprime en micro molaire ( $10^{-6}$ ) tandis que la concentration de fer soluble à pH neutre est de l'ordre de  $10^{-18}$  M (Handelsman et Stabb, 1996). Pour parer à ce déficit, deux stratégies existent chez les plantes. La stratégie 1 chez les non-graminées consiste à excréter des protons et à absorber *via* des transporteurs le fer préalablement réduit de  $Fe^{3+}$  à  $Fe^{2+}$ . La stratégie 2 est pratiquée par les graminées et consiste à excréter des phytosidérophores vers le sol qui se fixent au  $Fe^{3+}$ . Le complexe Fer-phytosidérophore, *via* des transporteurs, passe dans le cytoplasme des cellules végétales (Briat & Vert, 2004).

Chez les microorganismes, les sidérophores chélateurs du Fe sont une réponse à la faible concentration de Fe soluble dans la rhizosphère. Il a été montré que des complexes [Fer III-sidérophore] microbiens peuvent être une source de Fe pour les plantes de stratégie 1 et 2 (Bar-

Ness *et al.*, 1991) Ainsi, les microorganismes producteurs de sidérophores associés aux racines pourraient être une source de Fe pour les plantes (Nagata *et al.*, 2013).. Il existe trois hypothèses : i) le complexe [Fer III-sidérophore] peut être reconnu directement par la plante, ii) il se peut que le sidérophore soit dégradé et que le Fe soit absorbé par la racine, iii) ou enfin, qu'il y ait un échange de ligand, le sidérophore échange son Fe par un composé produit par la plante libérant ainsi du Fe dans la plante (Figure 25) (Rajkumar *et al.*, 2010). Les sidérophores pourraient également améliorer la biodisponibilité d'autres ETMs (comme le Ni) du sol en augmentant sa part soluble, ce qui jouerait sur la phytoextraction de façon directe ou indirecte (Khan *et al.*, 2017).

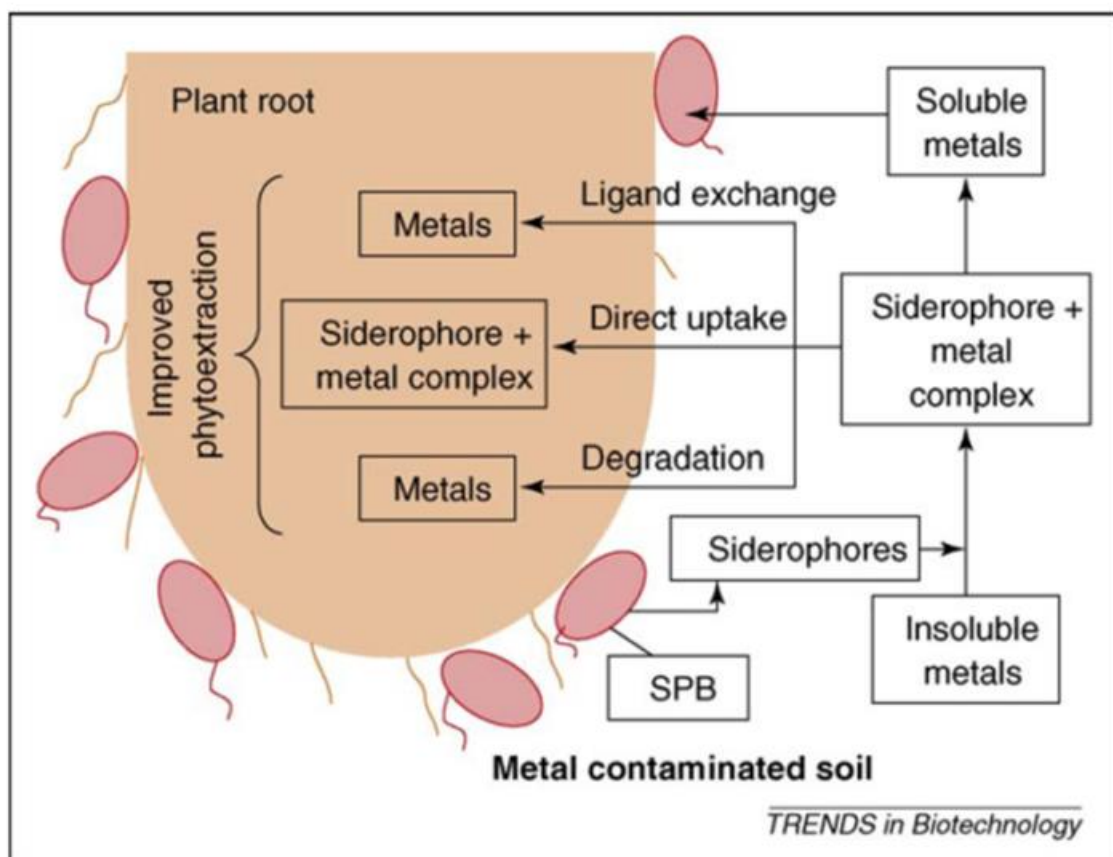


Figure 25 : Interaction des sidérophores bactériens avec les métaux présents dans les sols (Rajkumar *et al.*, 2010) ; SPB : Siderophore Producing Bacteria.

## 1.3 Techniques d'analyses des communautés microbiennes

### 1.3.1 La génomique environnementale : le métabarcoding

La génomique environnementale avec la méthode de « métabarcoding » vise à évaluer la représentativité des microorganismes qui composent la communauté microbienne associée à un habitat *via* l'étude des fragments d'ADN extraits de cet habitat. En effet, le séquençage haut débit d'ADNs environnementaux (ADNe) permet d'identifier et de quantifier les microorganismes présents à un instant donné dans un échantillon d'habitat donné. Ceci est possible en partant de deux postulats :

- ✓ La quantité d'ADN amplifiée par le processus de séquençage est représentative de la quantité d'ADN de départ et permet de quantifier la proportion de chaque organisme dans la communauté.
- ✓ Chaque organisme possède des régions de son ADN spécifiques de son espèce, qui permettent d'assigner l'organisme à une taxonomie. Typiquement les régions d'ADN ciblé en génomique environnementale sont l'ADN ribosomique 16S pour les procaryotes (bactéries), et 18S pour les eucaryotes (comme les champignons) (Figure 26).

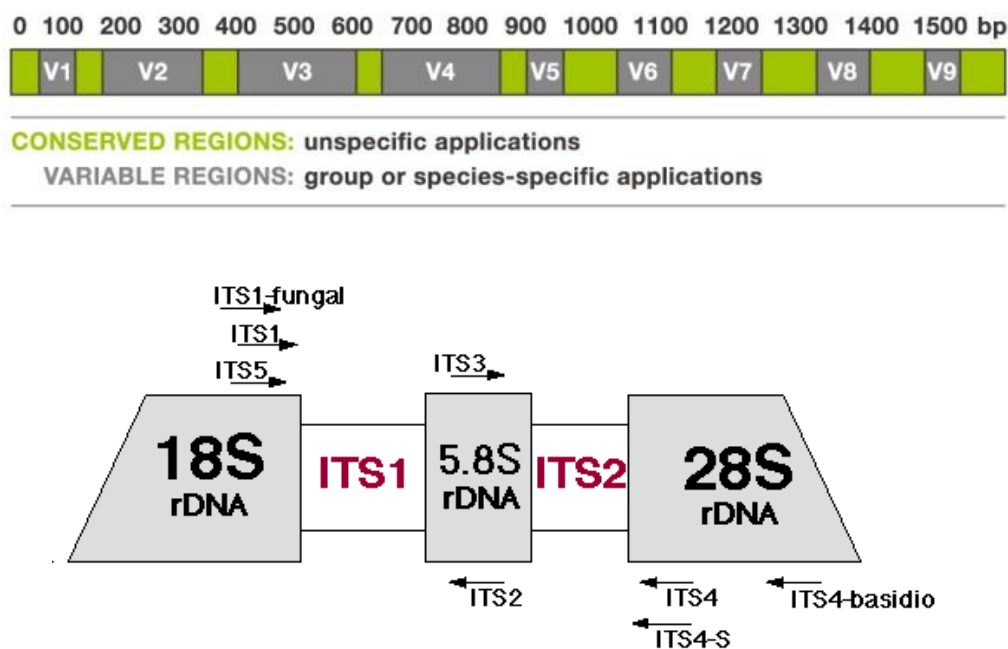


Figure 26 : Les régions amplifiées dans le cadre de la génomique environnementale, on parle de marqueurs génétiques. (Au dessus) Région 16S pour les procaryotes (bactéries) ; (En dessous) Région ITS pour les eucaryotes (champignons).

Ainsi, lorsque l'on isole et amplifie une portion spécifique dans l'ADN avec des méthodes de séquençages dites « hauts débits » (« High Throughput DNA Sequencing » ou HTS), ce sont alors des centaines de milliers, voire des millions de séquences (ou « reads ») qui sont générées. Il est alors possible de déterminer les espèces présentes et leur abondance relative à l'abondance des autres espèces détectées. Les microorganismes sont classés dans des groupes en fonction de la ressemblance de leurs séquences ADN amplifiées respectives. Ces groupes sont identifiés

sous le terme « Operational Taxonomic Units » (OTUs). L'utilisation du séquençage haut débit des marqueurs génétiques 16S et 18S est très utilisé par les scientifiques notamment pour appréhender les communautés de microorganismes associées aux plantes (Figure 27). D'une part, il permet de réaliser un inventaire plus approfondi des communautés microbiennes de nombreux habitats. D'autre part, il informe sur l'influence de nombreux paramètres physico-chimiques sur la structuration de ces communautés.

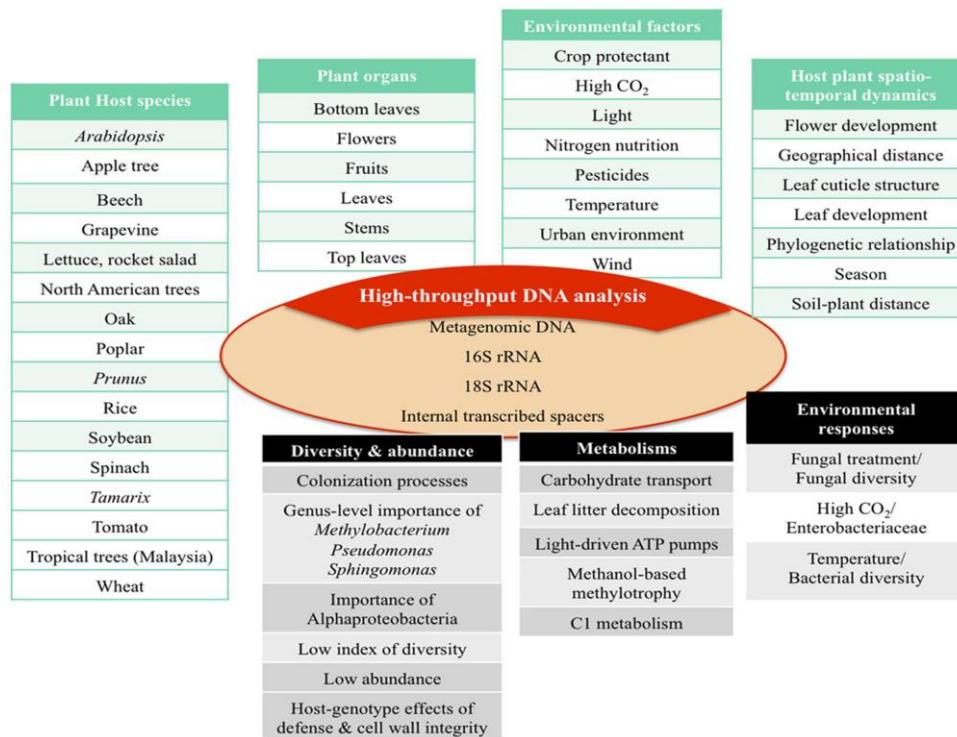


Figure 27 : Utilisation du séquençage haut débit des marqueurs génétiques 16S et 18S pour appréhender les microorganismes dans l'environnement (ici la phyllosphère) selon Bringel et Couée (2015).

### 1.3.2 Evolution du séquençage, trois générations de méthodes

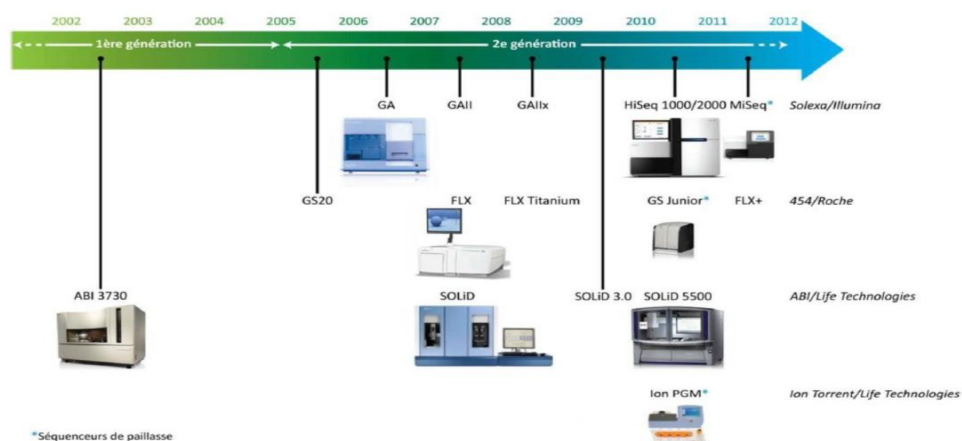
La technique dite de séquençage consiste à répliquer artificiellement l'ADN en ajoutant les nucléotides adéquats bout à bout. Cette dernière a beaucoup évolué avec les avancées technologiques et, ces dernières années, la rapidité de séquençage a été significativement augmentée. De plus, le coût du séquençage s'est effondré permettant une généralisation de l'emploi de la méthode.

En 1953, Watson et Crick théorisent pour la première fois la structuration de l'ADN en double hélice et, plus tard, en 1956, Meselson et Stahl montrent le caractère semi-conservatif de la réplication de ces molécules. Il faut attendre 1975 pour voir l'apparition des techniques de séquençage de première génération par synthèse enzymatique (Sanger *et al.*, 1977) ou par dégradation chimique sélective (Maxam & Gilbert, 1977). Sanger et ses collaborateurs réalisent en 1977 le séquençage entier du génome du virus  $\phi$ X1741 soit 5400 bases et de MS2 soit 3500 bases. Depuis, les génomes d'organismes plus complexes ont été entièrement séquencés à l'aide



de nouvelles technologies impliquant des méthodes de seconde génération. Par exemple, *Haemophilus influenzae* comptant 1,8 Méga bases (Fleischmann *et al.*, 1995) qui est considéré comme le premier organisme vivant séquencé, ou encore le génome de notre espèce en 2001, l' *Homo sapiens sapiens* comptant 2,9 Giga bases. C'est la méthode de Sanger, plus facilement adaptable à l'échelle industrielle que la méthode de Gilbert, qui fut utilisée et optimisée lors du projet de séquençage du génome humain. En effet, la méthode fut automatisée notamment grâce aux avancées technologiques dans les domaines informatiques et robotiques.

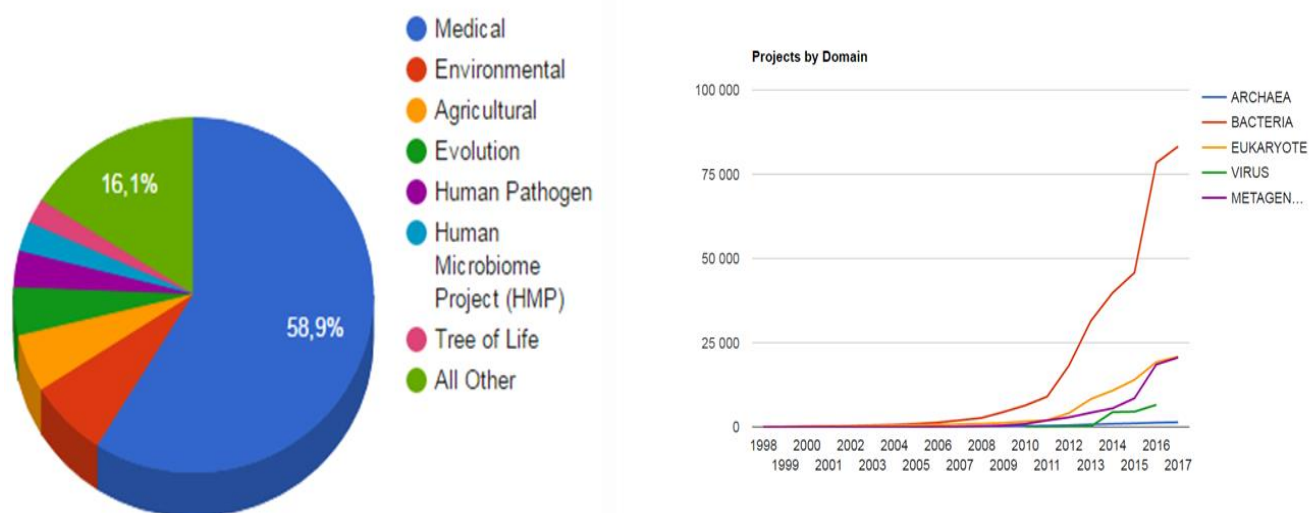
Les méthodes de séquençages de deuxième génération voient le prix du séquençage diminuer et le débit augmenter ; dans la littérature on parle souvent de séquençage « (très) haut débit » ou de séquençage de nouvelle génération. En effet, ces technologies ne nécessitent pas de clonages de l'ADN mais sont accomplies en cassant aléatoirement l'ADN en de petits fragments avant d'être séquencés, ceci permettant un séquençage massif en parallèle et une précision supérieure (Zhang *et al.*, 2011). Cette seconde génération de technologie est une véritable révolution pour le séquençage de génome et pour la génomique environnementale. La technologie du pyroséquençage 454 fut la première, mise au point par Roche en 2005, puis vient SOLiD de Life technologies et Solexa d'Illumina. Des séquenceurs plus compacts font ensuite leurs apparitions tels que le GS Junior (Roche) en 2009, l'Ion Torrent PGM (Life Technologies) en 2010 et le MiSeq (Illumina) en 2011 (Liu *et al.*, 2012). La chronologie de technologies de séquençage a déjà été réalisée dans la thèse de M. Ahakoud (2015) qui présente une synthèse très complète sur le domaine du séquençage (Figure 28).



**Figure 28 : Chronologie de la commercialisation des séquenceurs haut débit selon Ahakoud (2015)**

Il découle de l'apparition de ces nouvelles technologies une multiplication des projets de séquençage et les bases de données génomiques vont s'amplifier de façon exceptionnelle. Ainsi, en 2017, ce sont 270 567 organismes qui sont référencés par le Joint Genome Institute (JGI) dans la Genome OnLine Database (GOLD : <https://gold.jgi.doe.gov/statistics>). Les trois

domaines qui contribuent le plus à l'augmentation de la taille des bases de données sont le domaine médical, l'étude de l'évolution des génomes et le domaine de l'environnement. La multiplication des projets de séquençage s'amplifie après 2010 (Figure 29).



**Figure 29 : Projets de séquençage par domaine en 2012 (à gauche) et par sujet d'étude par an (à droite) selon le JGI.**

Les méthodes de séquençages de troisième génération consistent en un séquençage de masse qui se singularise par la capacité à séquencer directement des molécules d'ADN de façon individuelle sans nécessiter d'amplification, ce qui donne également pour avantage de pouvoir amplifier de l'ARN sans le convertir en ADN codant. Dans la littérature, on parle de SMS pour « Single Molecule Sequencing », ces méthodes ne sont pas encore commercialisées bien que la méthode de l'Ion Torrent (Life Technologies) comme celle de l' Helicos Genetic Analysis System (de Helicos BioScience) soient des méthodes entre la deuxième et la troisième génération. Les méthodes de séquençages de troisième génération ont le potentiel de générer des séquences d'ADN bien plus longues dans des temps plus courts et de façon bien moins coûteuse que les technologies de deuxième génération (Schadt *et al.*, 2010). Cependant, elles ne sont ni tout à fait adaptées pour la génomique environnementale, ni tout à fait au point. Par exemple, la méthode des nanopores est très prometteuse bien que des ajustements doivent encore y être apportés (Figure 30). En effet, cette méthode permet non seulement de séquencer avec une très haute précision (taux d'erreur 0.02 %), mais aussi de connaître l'état de méthylation de chaque nucléotide et d'obtenir des informations sur l'épissage de l'ADN. Pacific Biosciences et life technologie (projet Starlight) sont également lancés dans la course au SMS.

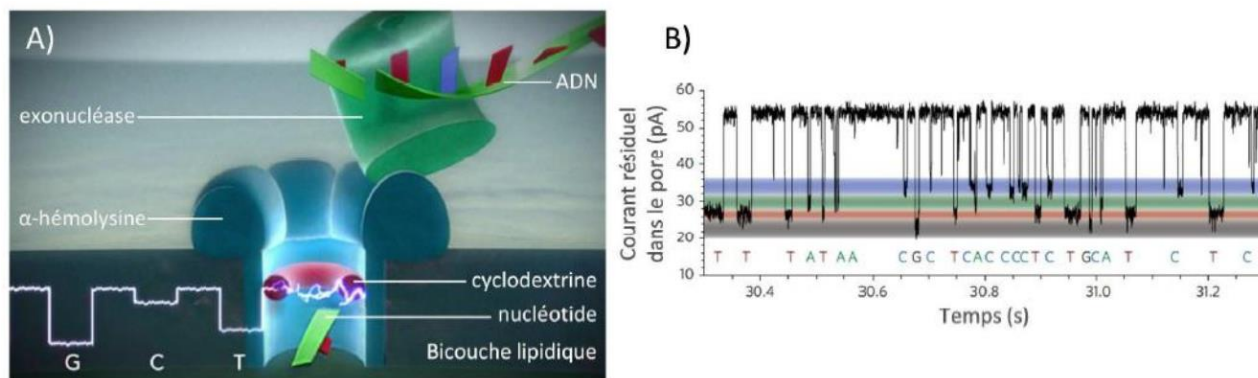


Figure 30 : A) Structures utilisées pour le séquençage d'une molécule d'ADN unique, B) Courant résiduel mesuré à travers le nanopore permettant de discriminer chaque nucléotide. Selon Ahakoud (2015)

### 1.3.3 Les trois principales technologies de séquençage de seconde génération et l'Ion Torrent PGM

Les trois technologies de seconde génération ont pour point commun quatre grandes étapes constitutives de la méthode : (i) la préparation des bibliothèques qui contient une étape d'amplification par PCR, (ii) les cycles de réactions de séquençage, (iii) la prise d'image après chacun de ces cycles pour déterminer le nucléotide correspondant, (iv) puis l'analyse des données. Ces technologies ont également en commun la mise en parallèle des réactions de séquençage et ainsi un haut débit et une haute résolution.

La technologie 454 Life Sciences commercialisée en 2005, depuis rachetée par Roche, est basée sur la liaison des fragments d'ADN à des billes en émulsion avant le pyroséquencage de l'ADN (

Figure 31). La particularité de cette méthode est liée à la « polymerase chaine reaction » (PCR), qui a lieu dans une microgoutte renfermant une microbille d'agarose en phase aqueuse, séparée des autres billes (plusieurs millions) par de l'huile. Ensuite, chacune des billes, sur lesquelles sont fixés les fragments d'ADN, est déposée dans un des 1,6 millions de puits d'un support solide PTP (PicoTiter Plate) (Metzker, 2010). Ces puits sont alors des contenants de l'ordre du pico litre abritant le pyroséquencage qui consiste à faire passer un flux de nucléotides, une base à la fois, et lorsqu'un nucléotide est fixé, un pyrophosphate (PPi) est relâché. Cette libération entraîne une chaîne de réactions qui aboutit à la production de lumière dont l'intensité est directement proportionnelle à la quantité de nucléotides fixés. Ainsi, à chaque flux sur la PTP il est possible de déterminer le type et le nombre de nucléotides ajoutés à la séquence. C'est cette technique qui a été utilisée pour le séquençage du premier être humain. Elle permet l'amplification de fragments d'ADN de 700 paires de bases (pb) à haut débit, environ 900 Mégabites de données en une dizaine d'heures, soit 15 000 fois plus qu'avec la première génération de séquenceurs, mais 700 fois moins qu'avec la technologie Illumina.

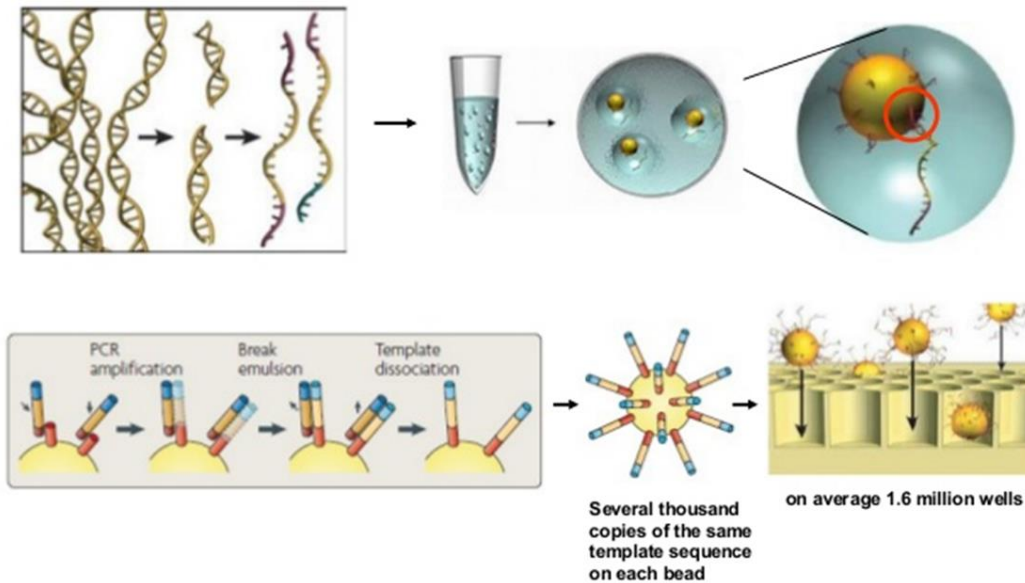


Figure 31 : Principe de la technologie de pyroséquence Roche 454 (Dametto, 2011)<sup>14</sup>.

Solexa commercialise le Genome Analyzer (GA) en 2006 avant d'être acheté par Illumina. La technologie Illumina repose sur l'utilisation d'adaptateurs terminateurs de chaînes réversibles marqués par des fluorophores et une amplification en pont des fragments à séquencer aussi nommée: « bridge PCR » (Figure 32).

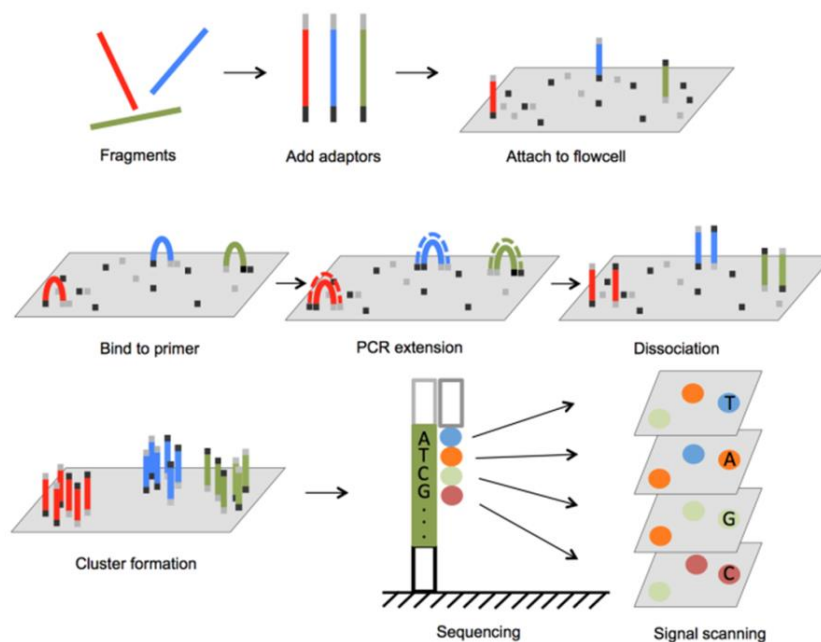


Figure 32 : Principe de la technologie de séquençage Illumina (Lu *et al.*, 2015).

Ceci permet une lecture dans les deux sens du même fragment d'ADN ce qui va nettement diminuer le taux d'erreur lors du séquençage. L'amplification des fragments d'ADN se déroule sur une plaque en verre appelée flow cell, similaire à une lame de microscope, qui

<sup>14</sup> <https://www.slideshare.net/PaoloDametto/new-generation-sequencing-technologies>

porte des amorces capables de s'hybrider avec les adaptateurs de fragments d'ADN. Un cycle à trois étapes se répète : (i) lorsque les adaptateurs des deux extrémités sont fixés à la FC les fragments forment un pont, (ii) ensuite une phase d'extension PCR a lieu formant un pont d'ADN double brin, (iii) puis à une des deux extrémités de chaque brin une phase de dénaturation permet de libérer le brin de la flow cell. La répétition du cycle engendre la formation d'un regroupement de réplicats du fragment d'ADN initial, on parle parfois de colonies d'ADN. Enfin, l'étape de libération consiste à supprimer les brins anti-sens par clivage. Lors de la phase de réplication, chaque nucléotide ajouté est lié à un fluorophore, et la lecture de la séquence se fait par excitation laser des complexes nucléotides-fluorophores et détection de la lumière émise. La technologie est optimisée jusqu'au développement du HiSeq et MiSeq Illumina en 2012, qui est capable de séquencer plus de 600 Gigabites de données en 10 jours, cependant la taille maximum des fragments est comprise entre 100 et 300 bp.

La technologie qui aboutit à SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) est commercialisée par Applied Biosystems (aujourd'hui Life Technologies) depuis 2007 (Figure 33).

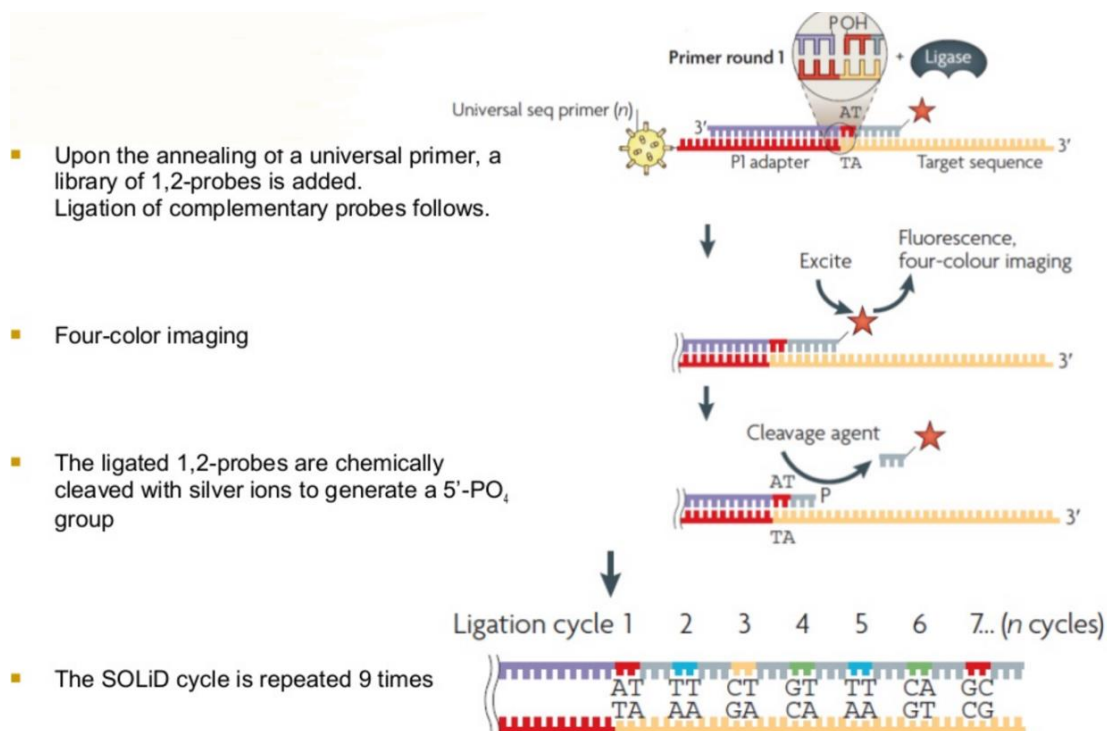


Figure 33 : Principe de la technologie de séquençage SOLiD (Dametto, 2011).

La spécificité de cette technologie se dévoile lors de l'amplification des fragments d'ADN au niveau de billes en émulsion. En effet, les nucléotides ne sont pas synthétisés un à un comme pour le pyroséquençage Roche 454, mais l'amplification repose sur la ligation d'oligonucléotides de 8 bases marqués par fluorescence des oligonucléotides, dit dégénérés,

possèdent deux bases identifiées et six bases dégénérées (non identifiées). Ainsi, lorsque l'oligonucléotide se fixe une lumière est émise permettant l'identification de ses deux premières bases. Ensuite, un clivage chimique retire les bases 6 à 8 et un nouvel oligonucléotide se fixe et ainsi de suite. De fait, les bases 3 à 5 ne seront pas identifiées lors de cette première phase de ligation. C'est ainsi qu'une nouvelle phase de ligation démarre à n-1 puis n-2, n-3..., « n » étant le nucléotide sur lequel s'est lié le premier oligonucléotide dégénéré. Cette technique implique que chaque nucléotide de la séquence est lu à deux reprises, ce qui améliore la précision du séquençage. Cependant, la technique reste extrêmement contraignante en temps d'analyse ce qui ne lui a pas permis de s'imposer sur le marché du séquençage.

La technologie Ion torrent PGM (Personal Genome Machine) est une technologie cadette des trois précédentes, également utilisée en génomique environnementale. Elle est basée sur des puces semi-conductrices portant de nombreux puits de façon analogue à la technologie Roche 454. Cependant, cette fois, c'est le relargage de protons et un changement du pH local qui sont détectés pour identifier les nucléotides incorporés. La technologie Ion Torrent supprime ainsi le besoin de lumière et de caméras pour étudier la séquence contrairement aux trois précédentes technologies, ce qui la distingue clairement des méthodes de secondes générations classiques. Le décryptage est alors facilité, cela réduit nettement la durée du séquençage et améliore son efficacité. Cependant, la technologie ne permet d'amplifier que des fragments courts (autour de 200 pb).

#### **1.3.4 Le métabarcoding et les communautés de microorganismes**

Globalement, c'est durant les années 2000 que démarre l'essor des projets de séquençages dans le domaine scientifique. De nos jours, les deux principales technologies de séquençages utilisées sont Roche 454 et Illumina HiSeq ou MiSeq, mais aussi la technologie de l'Ion torrent PGM (Figure 34). L'ADN environnemental s'est révélé être un intermédiaire efficace pour aborder les microorganismes dans toute la richesse et la complexité de leurs communautés et pour collecter des informations à propos de leurs rôles dans les écosystèmes.

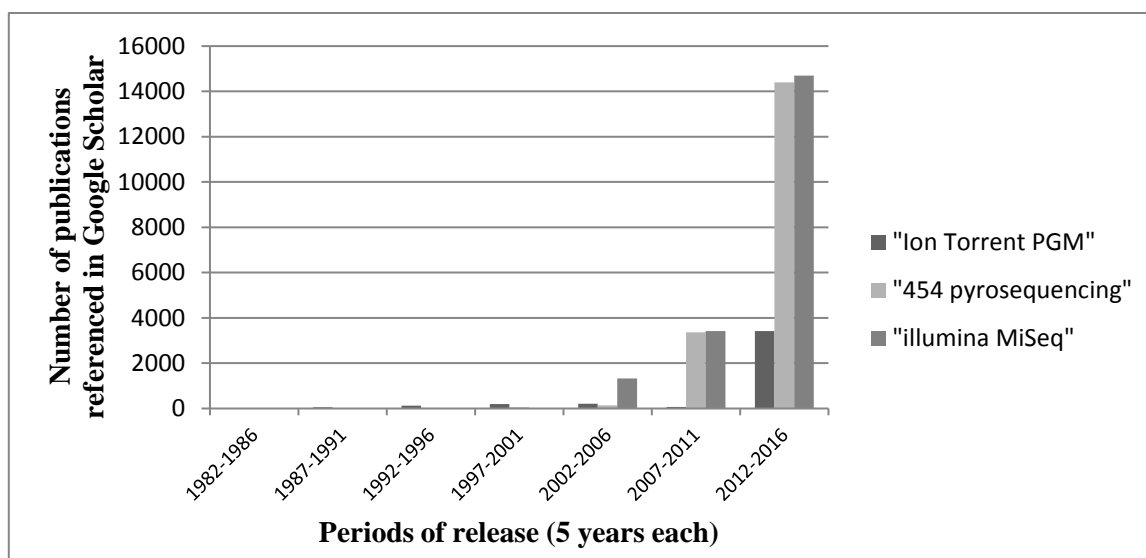


Figure 34 : Nombre de publications recensées *via* Google Scholar faisant référence aux technologies de l'Ion Torrent PGM, du pyroséquençage Roche 454 et d'Illumina MiSeq en fonction de la période de publication par tranche de 5 années depuis 1982 jusqu'à 2016.

La méthode Roche 454 a largement été utilisée depuis des années pour l'analyse des communautés microbiennes provenant des nombreux habitats ce qui a permis dans un premier temps de révéler la diversité des communautés microbiennes. Les technologies de très haut débit Illumina MiSeq ou Ion Torrent ont permis une meilleure profondeur de séquençage qui a montré encore davantage la structure et la composition des communautés.

Trois faits ont été mis en avant :

- ✓ des centaines d'OTUs différentes, ou des milliers lorsque des technologies de très haut débit ont été utilisées, composent ces associations de microorganismes. Puisque les OTUs sont construites pour correspondre à une définition de l'espèce en termes de variabilité des marqueurs génétiques 16S et 18S, il fait sens de comparer cette diversité avec celle accessible par des approches de cultures dépendantes. Le séquençage permet d'identifier une bien plus grande part du microbiome.
- ✓ le séquençage révèle que la structure et la composition des communautés de microorganismes sont très liées à l'habitat duquel elles proviennent et rend compte de l'énorme variabilité de ses microbiomes en fonction de leur environnement.
- ✓ de très nombreuses OTUs qui composent ses communautés d'organismes sont mal identifiées puisque, inconnues jusqu'alors, ne peuvent être rattachées qu'à des niveaux de taxonomie élevés (famille, ordre, classes ou phylum), montrant une nouvelle fois que notre connaissance des microorganismes dans leur environnement reste balbutiante.

Ces résultats sont valables pour une diversité d'écosystèmes du sol très large comme par exemple : les champignons de sols forestiers (Buée *et al.*, 2009), de sols alpins (prairie,

pâturage) (Lentendu *et al.*, 2011), de «soil crust» dans le désert (Zhang *et al.*, 2016), les bactéries des boues activées (Zhao *et al.*, 2014), issues de sols en Antarctique (Wang *et al.*, 2015), de prairies tempérées (Kaiser *et al.*, 2016), ou encore de sol de termitière (Makonde *et al.*, 2015). La meta-analyse des données générées par le séquençage des communautés de plus de 150 sols a permis de montrer des corrélations entre certains occupants de ces sols en utilisant les réseaux de co-occurrences (Barberán *et al.*, 2012). L'Ion Torrent a également été utile pour caractériser la diversité des communautés du sol (Urbina *et al.*, 2015) et des sols contaminés par les ETMs (Bell *et al.*, 2015; Zappelini *et al.*, 2015). La technologie Illumina MiSeq est aussi utilisée par exemple dans le cadre des sols forestiers (Žifčáková *et al.*, 2016), des pelouses (Zhalnina *et al.*, 2014) ou des sols arides (Couradeau *et al.*, 2016). La technologie Illumina MiSeq a été mise à contribution sur des sites perturbés lors d'une contamination par les ETMs (Belimov *et al.*, 2005; Chao *et al.*, 2016; Foulon *et al.*, 2016a,b; Durand *et al.*, 2017) ou encore contaminés par d'autres éléments (les terres rares ou «rare earth elements») (Chao *et al.*, 2016).

Les sols qui supportent un couvert végétal sont colonisés par les racines qui prospectent les nutriments pour ses végétaux et les communautés de microorganismes associées aux racines ont également été beaucoup étudiées par séquençage (Philippot *et al.*, 2013a). Si pour le microbiome du sol la pédologie est le facteur primordial affectant la structuration des communautés, aux niveaux des racines et de la rhizosphère, les études montrent qu'en plus de l'origine du sol, le génotype des plantes-hôtes est déterminant pour la structuration du microbiome associé aux racines. Ainsi, de nombreuses études portent sur les communautés bactériennes et fongiques dans, sur et à proximité des racines de nombreuses plantes : *Populus deltoides* (Shakya *et al.*, 2013), la comparaison entre *Pinus*, *Populus* et *Quercus* (Bonito *et al.*, 2014), *Populus Alba* et *Tremula* (Beckers *et al.*, 2017), *Pinus sylvestris* et *Pinus abies* (Menkis *et al.*, 2016), pour le maïs (Peiffer *et al.*, 2013) ou encore la laitue (Cardinale *et al.*, 2015). La technologie Illumina MiSeq est aussi utilisée pour déterminer les communautés rhizosphériques d'autres plantes comme par exemple *Arabis alpina* (Dombrowski *et al.*, 2016), *Avena fatua* (Shi *et al.*, 2015) ou encore *Lilium davidii* var. *unicolor*, mais aussi sur des sites enrichis en ETMs (Foulon *et al.*, 2016a; Das *et al.*, 2017)

La phyllosphère regroupe plusieurs habitats très différents vis-à-vis des racines ou du sol comme décrits précédemment. Cependant, les études de séquençages sont moins nombreuses dans ce domaine probablement du fait des difficultés techniques liées à la composition des plantes et, peut-être à un a priori, qui voudrait ces habitats moins riches ou moins importants pour le développement des plantes que le sol ou les racines. Les feuilles ont pourtant montré une diversité insoupçonnée et abritent un microbiome riche et divers qui joue



un rôle important pour la plante (Rastogi *et al.*, 2013). Les recherches menées portent sur des espèces ligneuses comme *Fagus sylvatica* (Cordier *et al.*, 2012) *Arabidopsis thaliana* (Badri *et al.*, 2013) ou encore la vigne (Perazzolli *et al.*, 2014). Les résultats dépendent beaucoup de la profondeur de séquençage atteinte (soit à savoir du nombre de séquences par échantillon) (Unterseher *et al.*, 2011), d'où l'intérêt du séquençage très haut débit Illumina MiSeq qui a été utilisé par exemple sur *Hedera sp.* (lierre) (Smets *et al.*, 2016), *Populus balsamifera L.* (Balint *et al.*, 2015), des graines de plantes de la famille des *Brassicaceae* (Barret *et al.*, 2015) ou, plus ambitieux, sur 57 arbres de la forêt de Panama (Kembel *et al.*, 2014).

Grace à l'approche des microbiomes par le métabarcoding des changements de structures et de diversités des communautés bactériennes et fongiques ont pu être reliés à de nombreux facteurs tels que le climat (Vick-Majors *et al.*, 2014; Balint *et al.*, 2015), les variations saisonnières (Jumpponen & Jones, 2010; Helgason *et al.*, 2014; Žifčáková *et al.*, 2016), les variations pédologiques en général (Tedersoo *et al.*, 2014a), le pH (Zhalnina *et al.*, 2014), la température du sol (Couradeau *et al.*, 2016), les stress notamment liés aux ETMs (Frossard *et al.*, 2017) ou encore le génotype de la plante hôte (Balint *et al.*, 2013) pour ne citer que les plus déterminants. Les variations biogéographiques ont des effets sur les microbiomes (Coleman-Derr *et al.*, 2015).

En outre, des travaux récents ont montré que l'effet sur le microbiome de la rhizosphère des facteurs climatiques, des perturbations du sol et de l'âge des communautés de microorganismes sont prédominants sur la richesse du couvert végétal (Tedersoo *et al.*, 2014b; Prober *et al.*, 2015). Plus brièvement, une publication a résumé de façon efficace les principaux facteurs impactant la structure, la diversité et la fonction des communautés du sol de prairie et de forêt en climat tempéré (Kaiser *et al.*, 2016). Les activités anthropiques sont également sources des changements importants pour le microbiome. Il a été montré que l'organisation en verger très structuré des arbres fruitiers et l'amendement des sols diminuaient la diversité de la communauté des AMF, ce qui suggère une plus faible adaptabilité de cette microfaune aux changements (Van Geel *et al.*, 2015). Le séquençage des microbes du sol a également mis en avant la sensibilité des communautés de microorganismes aux stress thermiques et le rôle des microorganismes pour la disponibilité des ressources du sol. Les résultats suggèrent que le réchauffement climatique global pourrait avoir un impact sur la qualité des sols par l'intermédiaire d'une diminution de la diversité du microbiome du sol (Tardy *et al.*, 2014). Une perte de la diversité du microbiome du sol a par ailleurs été corrélée à une diminution de l'activité de dénitrification et globalement affecte le cycle de l'N (Philippot *et al.*, 2013b).

Dans le sol, certaines des perturbations telles que la pollution des sols par le Hg, même à faible concentration, implique des changements rapides pour les microorganismes (Mahbub *et al.*, 2016a,b) (Figure 35).

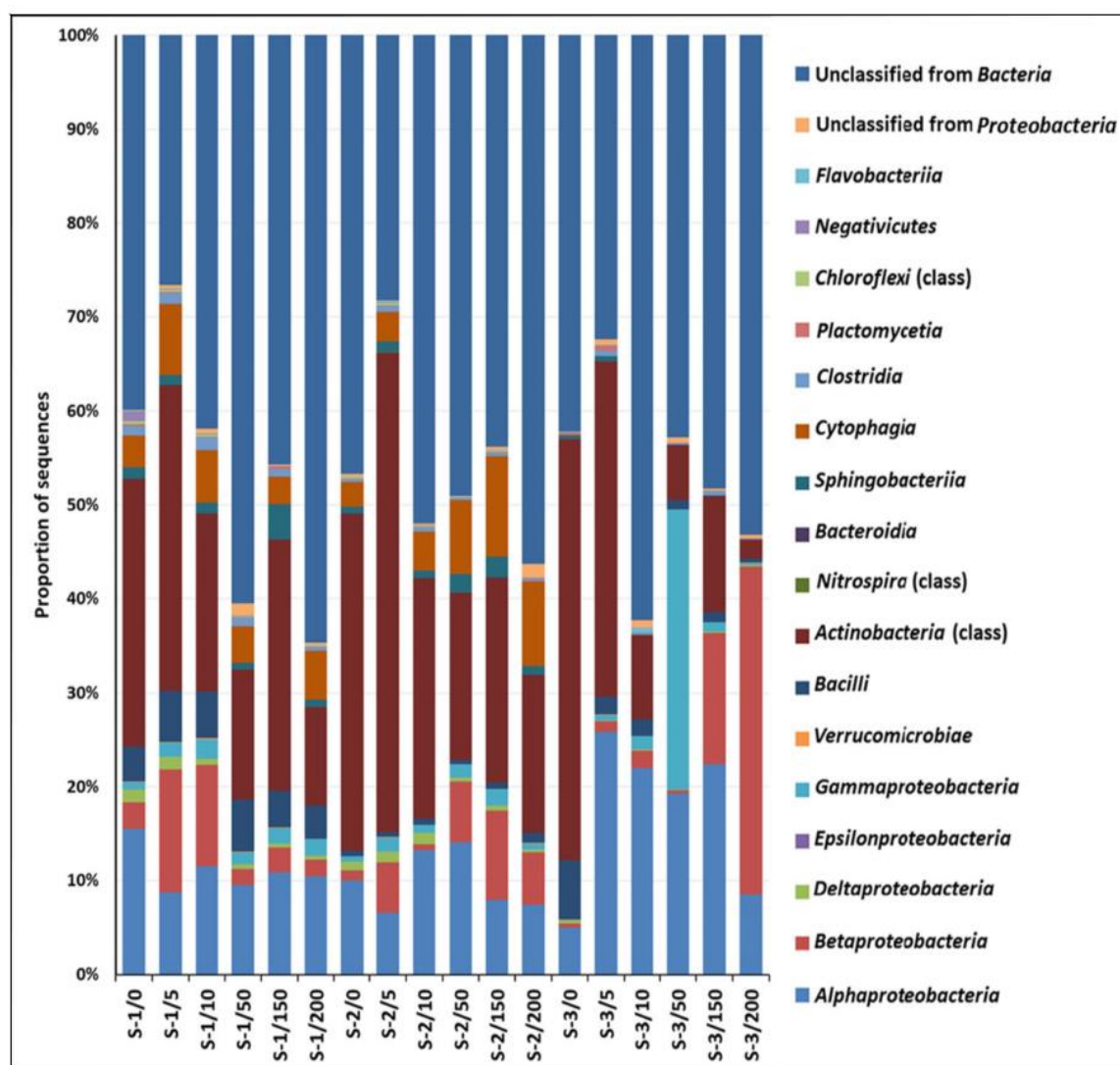


Figure 35 : L'abondance relative des familles bactériennes dans les 18 conditions : trois sols (0-15 cm de profondeur): S1 (zone résidentielle), S2(zone résidentielle) et S3(zone forestière) qui ont été enrichis en HgCl<sub>2</sub> pour atteindre des concentrations de 0, 5, 10, 50, 150 et 200 mg.kg<sup>-1</sup> de sol sec (Mahbub *et al.*, 2016b).

#### 1.4 Interactions between Hg and microbes: a review on microbial diversity and mechanisms, with an emphasis on fungal processes

Le Hg a été au centre du projet de thèse, et fait l'objet d'une attention particulière dans ce manuscrit. En effet, c'est un ETM dont de nombreux mécanismes sont mal compris encore à l'heure actuelle. Les interactions entre le Hg et les microorganismes font l'objet de nombreuses études pour élucider les phénomènes de transformation, de transport et

d'accumulation des différentes formes de Hg lors de son cycle biogéochimique. Les pages qui suivent font l'objet d'un manuscrit de synthèse en anglais qui décrit les connaissances actuelles sur les interactions entre Hg et microorganismes avec un intérêt particulier pour les champignons terrestres. Ce manuscrit sera soumis après publication des 3 manuscrits présentés dans ce document.

### **1.4.1 Introduction**

#### **1.4.1.1 History of Hg in the industrial and environmental contexts**

Long before modern science, the trace element (TE) mercury (Hg) was found to be a particular metal. Indeed, Hg found in the cinnabar ore (HgS) has specific chromatic properties and can be used as a pigment to applied brilliant red color (vermilion). The first traces of HgS use by humans were discovered during the Neolithic Age (ca. 4000–3000 BCE) as a preservative for human bones. Moreover civilization as Chinese, Egyptian, Hindu, Roman or Greece used vermilion on skeletons, sculptures, ceremonial cup, villa or painting (Parsons, 2015). Furthermore, Hg is liquid at ambient temperature, making it a special metal that Aristotle (384-322 BCE) referred to it as “fluid silver” and “quicksilver” (Wisniak, 2008). Indeed, Hg has one of lowest boiling point of all metals: 357C° at atmospheric pressure (Mukherjee *et al.*, 2004), subsequently many other properties were attached to Hg. Thus Hg was also used for religious ceremonies or as an ingredient in traditional medicines (Pal *et al.*, 2014).

Hg is rare; it is the 16th rarest element on Earth and is classified as one of the quantitatively most important pollutant group of TEs. Hg mostly exists as the elemental form (Hg<sup>0</sup>), inorganic divalent (Hg(II)), and organomercury compounds, such as monomethylmercury (MeHg) (Hsu-Kim *et al.*, 2013). MeHg poisoning due to fish consumption happened in the Minamata Bay, where a major accidental pollution was revealed in 1956. Studies on the Minamata disease pointed to impairment in intracellular calcium homeostasis, alteration of glutamate homeostasis and oxidative stress as important events in MeHg-induced neurotoxicity (Farina *et al.*, 2012) and is of concern because of its neurotoxic effects even at low concentrations (Lebel *et al.*, 1996). At that time, the marine products in the Minamata Bay displayed high levels of Hg contamination (5.61 to 35.7 ppm) and hair of patients, their family and inhabitants of the Shiranui Sea coastline were containing high levels of Hg (max. 705 ppm) (Harada, 1995). The growing interest for the fate of Hg in the environment revealed that the aquatic ecosystems are particularly sensitive to MeHg exposure due to the rapid biomagnification through the food webs a high concentrations in top aquatic predators like biggest fish or bird (Campbell *et al.*, 2008). The MeHg is also incorporated into bird eggs during

their formation (Provencher *et al.*, 2014) and can cross the mammalian placenta. Thus the human population is primarily exposed to MeHg by seafood consumption (Li *et al.*, 2014), but other studies design rice consumption as a possible source of Hg contamination (Meng *et al.*, 2014).

Hg is a pollutant that affects all groups of organisms and ecosystems including microbial communities (Rieder & Frey, 2013; Frossard *et al.*, 2017), fishes (Campbell *et al.*, 2008), plants (Wang, 2004; Chen & Yang, 2012), birds (Provencher *et al.*, 2014) and humans (Li *et al.*, 2014). Thereby, the Hg cycle and transfers within the biosphere have been widely studied to elucidate the fate of the Hg emitted into the aquatic (Lavoie *et al.*, 2013) and terrestrial (Mahbub *et al.* 2017) environments, for estimating and preventing the future dissemination of the Hg contamination. Nonetheless, the microbial processes implied in the cycle and the changes in microbial communities are still unclear. This review aims at exposing the current understanding of changes in microbial communities due to Hg-contamination as well as biotransformation and biomagnification of Hg in microorganisms, with special emphasizes on fungal organisms known as Hg bioaccumulators.

#### **1.4.1.2 Fate of Hg released from natural and anthropogenic sources**

Worldwide surveillance of Hg showed that it has a ubiquitous distribution among the world, occurring in all classes of igneous rocks suggesting a release in the atmosphere by volcanic activities in the early phase of earth. Thus the background level of Hg in all soils was around  $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$  DM (5 ppb) dry weight (Von Burg, 1995; Canil *et al.*, 2015), however with significant local variations. Indeed, large Hg deposits are located in China, Kyrgyzstan, Mexico, Peru and Russia, and exploitation of those ores are dominated by China, considered as the first producer accounting for 85% of the world production in 2016 according to Merchant Research and Consulting ltd. (<https://mcgroup.co.uk>). Hg ores generally contain around one percent of Hg ( $1000 \text{mg.kg}^{-1}$  DM), although some mines in Spain typically contain up to  $9000 \text{mg.kg}^{-1}$  DM (Wang *et al.*, 2012a). The Hg is also found in the fossil fuels like coal, gas and oil in non-negligible amount. For example, a study carried out in USA showed that among the 900 millions of tons of coal burnt in the year 1999, there were 75 tons of Hg (Pavlish *et al.*, 2003). Thus the mining activities and fossil fuels consumption released Hg, contained as TEs in geological stock (HgS), into the air, water and sediment. Hg is also released when used in products, or in industrial, and chemicals processes such as small-scale gold mining in China or Brazil, silver and lead mining, silver amalgamation for dental applications or chlor-alkali industrial processes. The global Hg consumption in 2005 was estimated around 3798 tons and

since the beginning of the industrial revolution, experts showed that Hg deposition in the environment at a global scale increased by a factor  $3 \pm 1$  (Lindberg *et al.*, 2007). Currently, the trends of global anthropogenic emissions show a decrease in Europe and North America between 1990 to 2010 because of the effort of industries, while nowadays worldwide emissions mostly come from East and Southeast Asia (Pacyna *et al.*, 2010) (Figure 36).

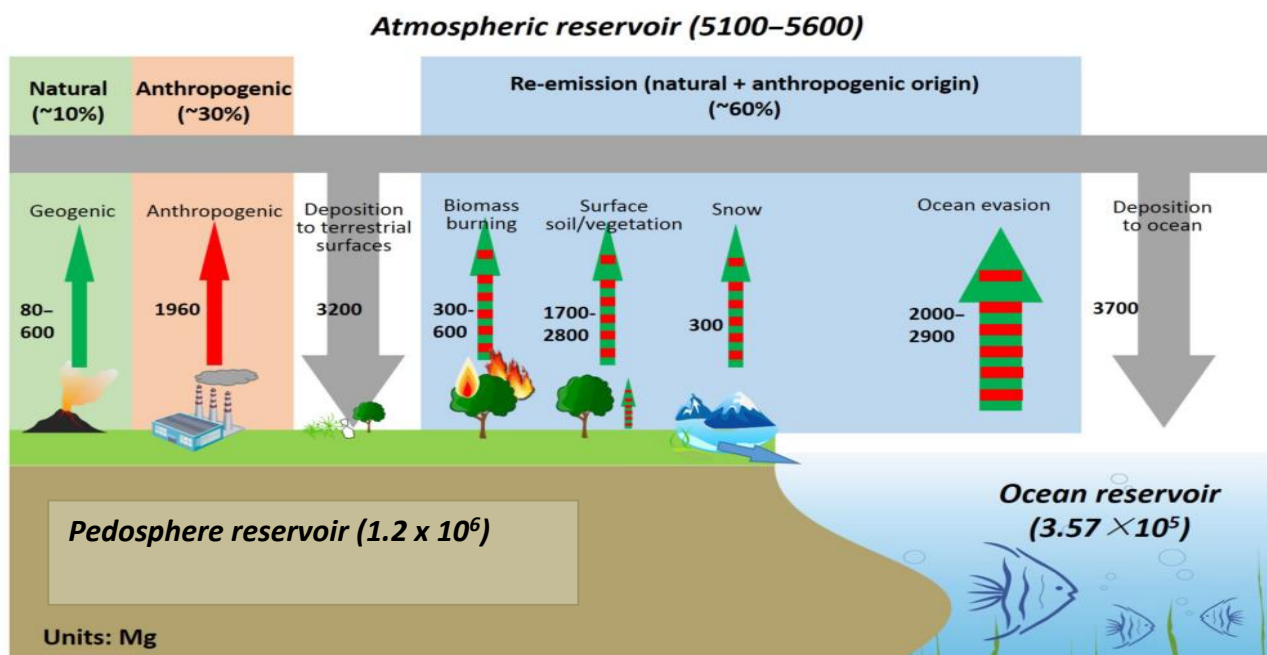


Figure 36 : The most recent Hg reservoirs and global atmosphere Hg inventory illustrating the exchange fluxes between atmosphere and Earth surfaces (Zhu *et al.*, 2016).

Hg is also released in the environment from natural sources like oceans and biomass burning (Zhou *et al.*, 2016). For 2008, an estimation of the ratio between emissions from anthropogenic and emissions from natural sources showed that anthropogenic sources account for 2320 tons of worldwide emitted Hg, mostly due to fossil fuel consumption (35%), while natural sources of Hg account for 5207 tons of Hg with dominance of volatilization from the oceans (52%) (Pirrone *et al.*, 2010). Due to its chemical properties, Hg volatilization occurred at low temperature and pH (optimal at 30 °C and at pH 2) and Hg migrates easily into the atmosphere (Takeuchi *et al.*, 2001). The atmospheric Hg is dominated by the extremely volatile form  $\text{Hg}^0$  (generally > 95% of total airborne Hg), whereas only minor amount of other species (mainly particulate-phase Hg ( $\text{Hg}(\text{p})$ ) have been detected (Stratton & Lindberg, 1995). The  $\text{Hg}^0$  can be oxidized into mercuric ion ( $\text{Hg}^{2+}$ ) in the earth atmosphere by a photo chemical reaction, then it may be precipitated by rainfall and dry deposition (Bacci *et al.*, 1994; Paige Wright *et al.*, 2016). The oxidized Hg finally fall on terrestrial surface (60%) and into the aquatic systems (40%) (Mahbub *et al.*, 2017). Thus Hg is released in both local and global scope in both marine

and terrestrial environments, and in such context, Hg deposits encounter microscopic life as previously well schematically described (Stern *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2016). The microorganisms play a central role in natural reemission of Hg and are involved in the first steps of the biomagnification process (Figure 37).

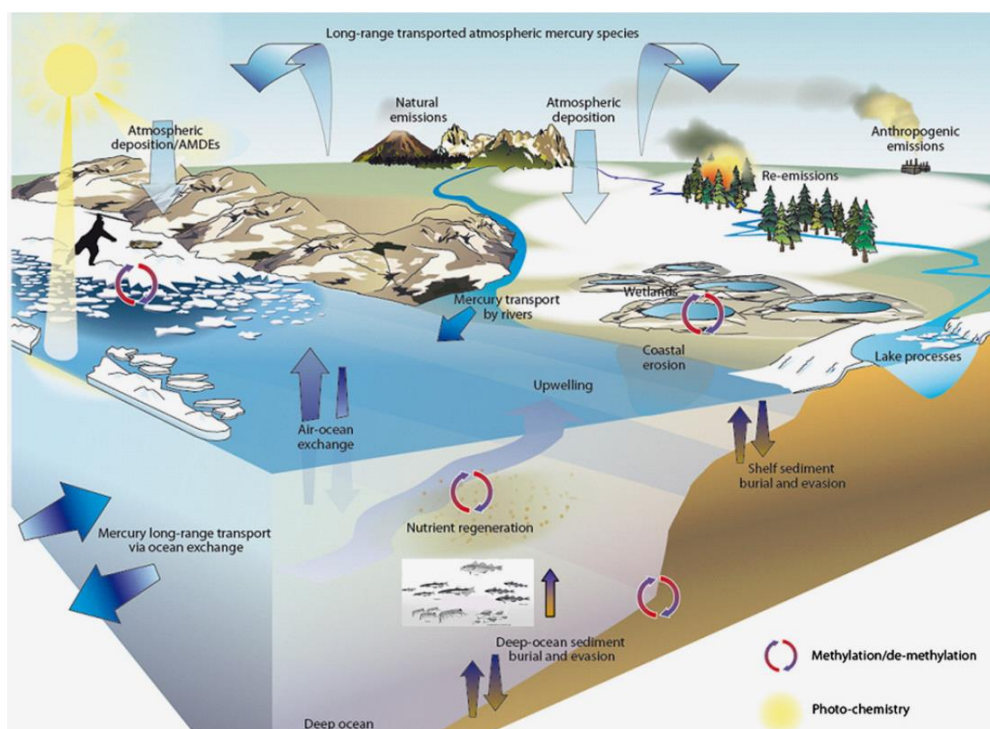


Figure 37 : Cycling of Hg through the Arctic marine and terrestrial ecosystems (Stern *et al.*, 2012).

## 1.4.2 Assessing the impact of Hg on the soil fungal communities

A disturbance in the soil can imply for microorganisms: i) the adaptation of the indigenous microorganisms, or, ii) a change in the composition of the community. Scientific understanding of Hg effects on soil fungal communities has progressed by the used of several approaches that we aimed to present here.

### 1.4.2.1 Traditional methods

Common approaches to study Hg toxicity towards fungi consist in measuring growth rate of fungal strains on Hg-enriched synthetic growth media. The Hg chemical form mostly used is  $\text{HgCl}_2$ . Under axenic conditions Hg fully inhibited the growth of 9 species of wood-rotting fungi at concentration ranging between 5 to 50  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  (Baldrian & Gabriel, 1997). In the same Hg concentration range, the growth of 21 fungi isolated from soils was inhibited (Sanglimsuwan *et al.*, 1993). Hg was the most toxic element tested in these two studies, when compared with Cd, Co, Cr, Cu, Mn, and Pb (Tableau 12 :).

Tableau 12 : Minimal inhibitory concentrations (MIC) of 21 fungal strains on Hg-enriched synthetic growth media (Sanglimsuwan *et al.*, 1993).

Microorganism	MIC <sup>a</sup> (mM)					
	Cu	Cd	Zn	Ni	Co	Hg
<i>Pleurotus abalonus</i> M 90-6	7	2	7	5	2	0.2
<i>Pleurotus abalonus</i> M 90-2	7	2	7	3	3	0.2
<i>Pleurotus salmoneostramineus</i>	15	3	10	7	2	0.3
<i>Pleurotus cystidiosus</i> M 87-11	15	0.5	7	2	2	0.5
<i>Pleurotus cystidiosus</i> M 91-1	15	0.5	15	0.7	5	0.5
<i>Pleurotus ostreatus</i> M 87-12	20	5	15	7	3	0.5
<i>Pleurotus ostreatus</i> Tohoku H67	20	5	15	7	3	0.5
<i>Agrocybe cylindracea</i> M 89-1	5	5	7	5	1	0.3
<i>Cryptoporus volvatus</i> M 91-1	7	3	7	5	5	0.2
<i>Pycnoporus coccineus</i> M 85-2	7	2	5	3	3	0.05
<i>Pycnoporus coccineus</i> M 89-2	7	2	5	3	3	0.05
<i>Coriolus versicolor</i> M 87-4	7	2	7	2	3	0.3
<i>Inonotus mikadoi</i> HUT 9021	7	3	7	5	5	0.3
<i>Lampteromyces japonicus</i> M 87-13	5	1	10	3	2	0.1
<i>Grifola frondosa</i> M 90-3	12	0.5	7	2.5	3	0.2
<i>Pholiota adiposa</i> M 90-4	5	0.5	7	3.5	4	0.1
<i>Pholiota nameko</i> M 88-2	5	0.5	5	2	1	0.1
<i>Flammulina veltipes</i> M 90-7	5	0.5	5.5	2	2	0.1
<i>Lyophyllum ulmarium</i> M 90-9	3	0.5	5	2	3	0.1
<i>Agaricus bisporus</i> M 90-8	5	0.5	3	2	1	0.1
<i>Polyporus arcularius</i> BS 4/8	5	0.5	5	2	1	0.1

<sup>a</sup> Growth of microorganisms was measured after 1 wk. cultivation in medium containing various concentrations of metals.

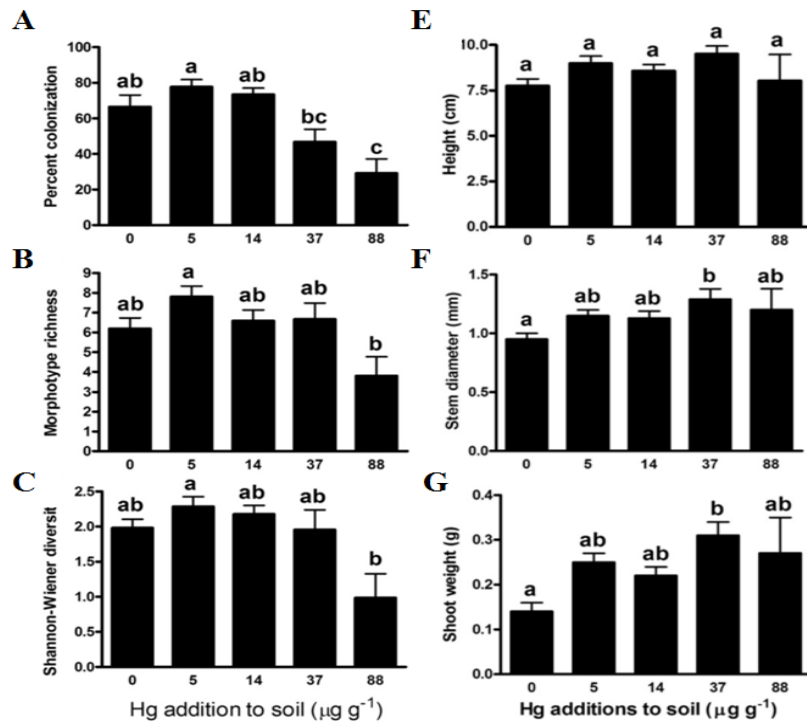
In *Ganoderma lucidum*, toxicity of TEs has been classified in the following order: Hg>Cd>Cu>U>Pb>Mn=Zn (Tham *et al.*, 1999). A negative effect of Hg is reported for 6 species of ectomycorrhizal (ECM) fungi with a decrease of radial growth rate and biomass production at ten time lower range of Hg concentration that used in previous work (Sanglimsuwan *et al.*, 1993; Baldrian & Gabriel, 1997).

The time between the inoculation of the mycelia tips on Petri dish and the beginning of the radial growth named lag phase increases in the presence of Hg in the medium. Furthermore, already established ECM colonies are less sensitive to Hg that could indicate a potential Hg resistance mechanism of fungi. However, the Hg may also be passively adsorbed on the initial mycelium tips or on established fungal colonies decreasing locally the Hg concentration and allowing the fungal growth. On Hg-enriched agar plate, Hg reduced or completely inhibited the growth of all the fungi strains tested and especially from wood-rotting and ECM fungi strains involved in the plant nutrition and in the organic matter turnover in soil (Sanglimsuwan *et al.*, 1993; Baldrian & Gabriel, 1997). The decrease of fungal growth rates in response to Hg could

potentially indicates a decrease of soil colonization and mycorrhization rates. However, axenic approaches are probably not representative of the complexity of the ecotoxicity mechanisms, which can occur in soil. In a field experiment, Jean-Philippe et al. (2011) investigated the effects of Hg on mycorrhizal fungi along a long-term Hg-contaminated gradient up to 758 mg total Hg (THg).kg<sup>-1</sup> of dry soil. Even though the maximal Hg concentration was relatively high in comparison with Hg-enriched plate approach, they found no correlation between Hg and ECM fungal abundance. But they highlighted a significant negative correlation between THg and arbuscular mycorrhizal (AM) fungal abundance on plant roots.

The other commonly used approach to study the effect of Hg on soil fungal community is to artificially contaminate soil with HgCl<sub>2</sub> in a laboratory-based procedure such as in the experiment of Baldrian et al. (2000), which demonstrated that soil colonization by the white-rot *Pleurotus* was strongly inhibited by 100 mg Hg/kg. In addition, *Pinus rigida* seedlings growing on artificially contaminated soil presented a decrease of colonization of their root system by ECM fungi at 88 mg HgCl<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup> soil while no decreased of richness and diversity of those ECM were detected at lower concentrations (Crane *et al.*, 2012). However, those inhibitions may not be a direct effect of Hg on fungi. Indeed, the mycorrhiza formation is the resulting of an interaction between two partners, which could be impacted differently by the Hg as well as the biological process of interaction itself. It is important to consider whether the selected experimental designs reflect acute or chronic effects of Hg on soil fungal community. Field experiment with long term Hg exposure can be considered as a chronic Hg exposure whereas experiments with artificial soil contamination in controlled conditions should be considered as an acute exposure to Hg. In the field, chronic exposure did not reveal a significant effect of Hg on soil fungal abundance except on AM fungi (Muller *et al.*, 2001; Jean-Philippe *et al.*, 2011; Ruggiero *et al.*, 2011) (Figure 38).





**Figure 38 :** Effects of Hg concentrations in the soil for: A) Root colonization by ECM; B) Morphotype richness of ECM; C) ECM diversity (Shannon indices); E) Height of *Pinus rigida* shoot (cm); F) Stem diameter of *Pinus rigida* (mm); G) Shoot weight of *Pinus rigida* (g) (Crane *et al.*, 2012).

We propose the hypothesis that the Hg tolerance of fungi in the soil implied a fungal adaptation to Hg contamination, but other factors can bias this conclusion. The study of Hg effect on soil microbial community along natural or anthropogenic Hg contaminated soil gradient is tricky. The main difficulty is to locate an experimental site for which soil parameters are identical along the gradient of Hg. Many sites are multi-contaminated due to the human industrial activities and the co-occurrence of Hg with other metallic or organic contaminants may limit the scientific conclusions, especially due to its faculty to create an amalgam with many other metals. For example, it has been showed that Pb<sup>2+</sup> accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* dead cells is negatively correlated with Hg<sup>2+</sup> presence in the liquid media (Suh & Kim, 2000). The chlor-alkali industry, which contributes to Hg emission sources, can also release organo-chlorine compounds in the soil, which may have toxic effects for soil microorganisms (Grangeon *et al.*, 2012; Foulon *et al.*, 2016b). Moreover, the assessment of concentrations in organic compounds in soil remains limited in the case of field experiment. To avoid misconclusions, the assessment of soil physical and chemical parameters as well as potential contaminants is a crucial step to highlight the effects of Hg on soil microbial communities. In the case of long-term Hg exposure, the fraction of bioavailable Hg can be very low due to its biosorption on organic matter or on other soil parameters. The most commonly used method to defined bioavailable metals requires digestion by weak acids and chemical analysis. However, determination of bioavailable Hg for soil microorganisms require biosensor

such as the *mer-lux* biosensor (Rasmussen *et al.*, 2000). Muller *et al.* (2001) have used such biosensor and investigate Hg effect along a gradient of Hg concentrations in soil. For the two lower THg concentrated soils, no bioavailable Hg was measured and for the highly Hg-concentrated soil the bioavailable Hg was approximately 2000 times lower than the THg concentration. In addition, several more or less toxic chemical forms of Hg may potentially contribute to the THg. Therefore, assessment of bioavailable Hg concentration in soil and its main chemical forms is a key feature for field experiments because the concentrations of bioavailable Hg are potentially very low and the main chemical forms of Hg are *a priori* unknown.

In controlled conditions, the experiments of artificial soil contamination with Hg showed effects of acute contamination (Crane *et al.*, 2012). It revealed a decrease in the root colonization by ECM fungi and a decrease of soil colonization by wood decaying fungi. In the case of soil spiking with Hg in laboratory, the concentration of Hg for which a negative effect was observed on growth or mycorrhiza colonization were close to the concentrations used in axenic conditions. This phenomenon can be explained by the fact that Hg was potentially bioavailable just after her spiking in soil.

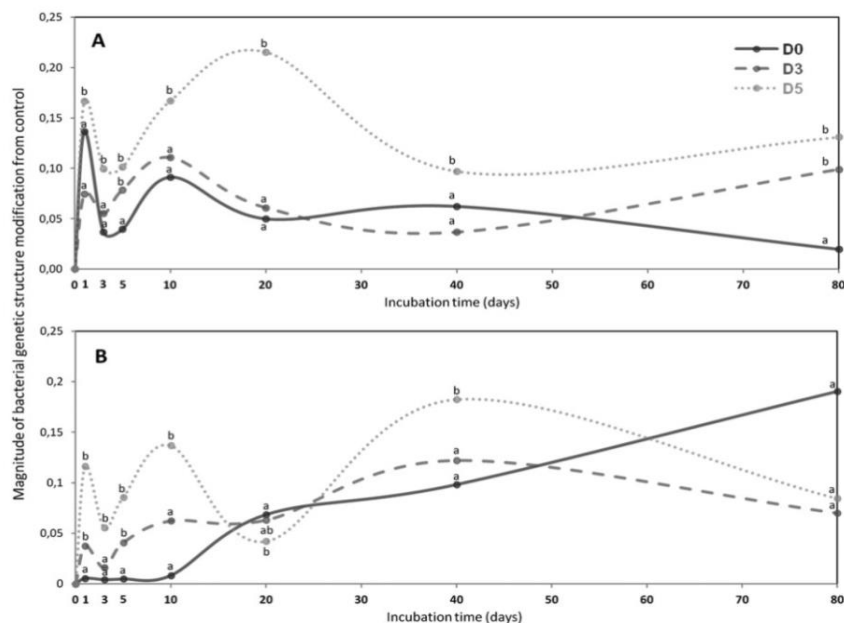
Scientific techniques described in this section are basic, mainly due to the fact that the experiments were carried few years ago, especially for the assessment of fungal biomass or soil colonization and should be supported by more novel techniques as for example the phospholipid-derived fatty acids (PLFA) analysis, measurement of ergosterol or quantitative polymerase chain reaction (qPCR) of fungal markers. The effect of Hg on soil fungal community structure remains poorly investigated, whether under chronic or acute exposure.

#### **1.4.2.2 Molecular methods**

More recently, several molecular approaches have been employed to study the effect of Hg exposure on fungal community structure. Nonetheless, very few studies followed the changes of fungal communities exposed to Hg at the field level.

Rieder and Frey (2013) use a T-RFLP approach to demonstrate that the structure of soil fungal community was not significantly affected (5 T-RFLP profiles on 66-90) by a spiked of MeHg ranging from  $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$  and was not affected by the gradient ranging from 5 and  $90 \mu\text{g.kg}^{-1}$  DM MeHg. Conversely, 13 % of the bacterial T-RFLP profiles were significantly affected at  $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$  DM MeHg and 23 % at  $90 \mu\text{g.kg}^{-1}$  DM. This study showed that Hg stress is highly dependent of soil properties and proposed a critical limit (environmental impacts) concentration for soluble Hg of  $4 \text{ ng.kg}^{-1}$  DM (Frey & Rieder, 2013). Another study, using the Automated

Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) explored responses of the fungal community to a Hg stress with a spike of 20 µg HgCl<sub>2</sub>/g dry soil (Tardy *et al.*, 2014). After only one day of exposure they found a change in the genetic structure of several fungal communities and the authors also showed that Hg contamination significantly decreased soil respiration (Figure 39).



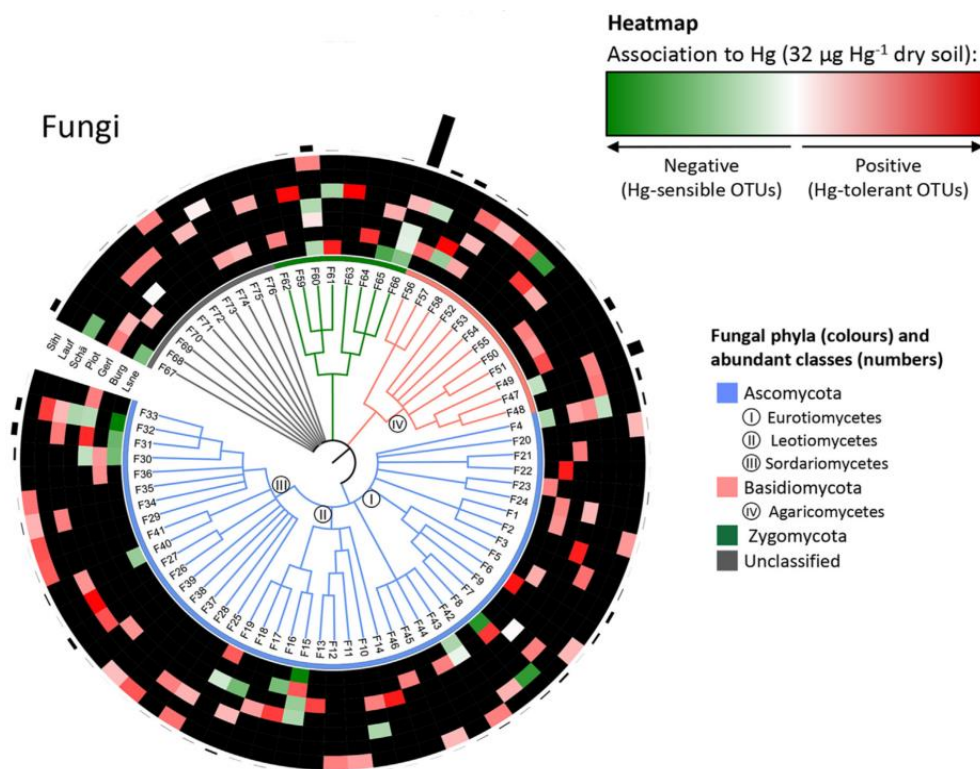
**Figure 39 :** ARISA showing magnitude of the bacterial genetic structure modifications during 80 days after (A) heat stress and (B) mercury pollution for the three levels of diversity; D0 (black full line), D3 (grey dotted line) and D5 (light grey dashed line). Magnitude was determined by calculating the Euclidean distance between disturbed and control microcosms for each incubation time. Notation indicates a significantly different response (Kruska–Wallis test;  $P < 0.05$ ) in terms of genetic structure change between the three levels of diversity (Tardy *et al.*, 2014).

In addition, the carbon mineralization also showed a significant decreased as showed in other studies (Müller, 2001; Harris-Hellal *et al.*, 2009), that the authors proposed to be related to the fixation of Hg to organic matter limiting its biodegradability by microbial activities. Trying to measure a rapid effect on the structure of soil fungal community after Hg addition can be difficult with molecular approaches based on DNA. Indeed, in the case of acute Hg exposure, the time between the addition of Hg and the environmental DNA extraction is short and dead fungi can liberate free DNA, which might not be readily degraded. In consequence, this relic DNA could obscure the structural changes of the community in response to Hg (Carini *et al.*, 2016). This bias is potentially more important for fungi than for bacteria because they have longer generation periods.

High-throughput sequencing (HTS) metabarcoding technologies have modernized the method to investigate microbial communities in the field of microbial ecology by enabling high-resolution community profiling. The most commonly tools used by scientists during the last decade was the 454 pyrosequencing, the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) and the Illumina MiSeq platform.

The Ion Torrent PGM sequencing tool was used to compare fungal communities from an undisturbed soil and an Hg contaminated chlor-alkali tailing dump (Zappellini et al. 2015). It revealed an increase of the *Ascomycota* compared to *Basidiomycota* with a significant decrease of the *Agaricomycetes* and few dominant fungal taxa in disturbed soil such as *Hebeloma* and *Geopora* (Zappellini et al. 2015). On the same site, a recent study using Illumina MiSeq platform focus on the disturbed soil. The experiment surveyed the potential changes in fungal communities associated to a poplar plantation at Hg concentrations ranging from 2.92 to 9.08  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  DM (Durand *et al.*, 2017). Results showed a correlation between a decrease of the soil fungal diversity and the increase of Hg concentration, while no significant effect was found for root, stem and leaf habitats. The *Trichoderma* taxon was found to be the most abundant of the chlor-alkali disturbed soil, which agreed with previous work that demonstrated the high resistance of *Trichoderma harzianum* to 0.1  $\mu\text{g/g}$   $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  and  $\text{HgCl}_2$  on axenic cultures with a growth decrease of only 7.5 % for the second one (Puglisi *et al.*, 2012).

In the study by Frossard et al. (2017), the use of 454 pyrosequencing tools allowed for studying structure and diversity of the fungal communities of 7 soils enriched with Hg, following a gradient of  $\text{HgCl}_2$  (0.32, 3.2 and 32  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  DM). The changes in the fungal community were clearly revealed for 32  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  DM, while lower Hg concentrations had a limited impact (Figure 40). This taxon seems of great interest due to its abundance in Hg enriched soil and its potential of Hg resistance. Otherwise, soils with the highest amounts of clay showed the less bioavailable Hg, nonetheless, changes in the fungal communities were still significant in those soils. The development of HTS molecular identification methods should focus on two major weaknesses: i) the technical shortcomings leading to biases for the understanding of fungal ecology (Tedersoo *et al.*, 2015), ii) the lack of functional knowledge for the majority of fungi compare to the enormous DNA sequenced dataset available (Peay et al. 2008; Peay 2014). For a better understanding of fungal community ecology, the HTS should be combined with other approaches such as co-occurrence network analysis, RNA sequencing and proteomics, because HTS alone provides only scarce ecological breakthrough. However, new tools are design for HTS users give easy access to the accumulated fungal ecology knowledge (Nguyen *et al.*, 2015). Those tools should be diversified and improved for future studies on microorganisms in their ecosystems.



**Figure 40 :** Taxonomic tree of the Hg indicator OTUs (i.e. OTUs significantly correlated with the 32  $\mu\text{g Hg.g}^{-1}$  dry soil treatment, defined as  $P < 0.05$ , correlation coefficient  $\leq -0.3$  or  $\geq 0.3$  and abundance  $>10$  sequences) of the fungal communities of the different soils. The different colored tree branches represent the different phyla, and the numbers indicate abundance classes. A heatmap surrounding the tree represents the association strength of the OTUs: red positive association (indicating tolerant OTUs), green negative association (indicating sensitive OTUs), black no value (OTUs not present or not an indicator OTU) for each soil. The bar plot surrounding the heatmap represents the OTUs abundance (i.e. number of sequences) (Frossard *et al.*, 2017).

### 1.4.3 Impact of Hg on the soil bacterial communities

Bacteria are prokaryotic cells that differ from fungi by many aspects and their responses to Hg exposure have also been studied. As previously exposed for fungi, progresses for understanding Hg effects on soil bacterial communities through the use of several approaches are reviewed here.

#### 1.4.3.1 Traditional methods

One of the most widely used techniques to study the effect of Hg exposure on bacteria community relies on the assessment of Viable Heterotrophic Bacteria (VHB) and the number of Hg resistant bacteria on  $\text{HgCl}_2$  enriched media (Bressan *et al.*, 2008; Ruggiero *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2016).

In the literature, responses of the VHB number to an acute Hg exposure remain contrasted. A study on the bacterial structure of bacterial communities after various types of perturbations showed that the addition of 100  $\text{mg HgCl}_2.\text{kg}^{-1}$  DM of soil lead to a decrease of the VHB number (Bressan *et al.*, 2008). However, unexpectedly soil types such as, pasture,

cultivated, forest and industrial, Hg spiking generally did not affect the VHB percentage (Ranjard *et al.*, 1997, 2000; Muller *et al.*, 2001; Harris-Hellal *et al.*, 2009). Moreover, in the case of acute Hg exposure, an enrichment of Hg resistant bacteria was often described (Ranjard *et al.*, 1997; Drønen *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2001; Rasmussen & Sorensen, 2001; Holtze *et al.*, 2006; Ruggiero *et al.*, 2011). The Hg resistant bacteria enrichment could explain the stable number of VHB before and after acute exposure or compared to Hg control soils. Nevertheless, an increase of soil VHB can be measured in response to Hg exposure (Faassen, 1973; Rasmussen & Sorensen, 2001). Those facts may be related to biases due to agar plate growth. Indeed, when non-resistant bacteria died, the new nutritional equilibrium allow resistant bacteria to develop on agar plates where r-strategist bacteria are probably advantaged compared to k-strategist, resulting in an increase of the VHB measured after a short term Hg exposure. By contrast, a decrease in the number of VHB after a Hg exposure is also described in many studies (Ranjard *et al.*, 1997; Holtze *et al.*, 2006; Ruggiero *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2014). Thus, the ratio k-strategist/r-strategist could increase with acute Hg exposure but only on specific conditions. The selection of r-strategist bacteria can affect the functional diversity assessment of bacterial community in response of Hg spiking.

One of the main approaches to study the heterotrophic bacterial functional diversity is based on the Biolog EcoPlate™, which was created specifically for community analysis and microbial ecological studies. In the case of an enrichment of cultivable bacteria in comparison with a control, the Biolog EcoPlate™ results, which are dependent of the cultivable community activity, could be strongly impacted. Thus, the decrease or the increase of bacterial functional diversity after Hg exposure evaluate with Biolog EcoPlate™ could be explained by a change in the k-strategist/r-strategist ratio in the bacterial communities (Rasmussen & Sorensen, 2001; Harris-Hellal *et al.*, 2009). When the Hg resistant bacteria percentage generally increases after Hg exposure, scientists have nonetheless observed a decrease of the Hg resistant bacteria percentage, only few days after Hg spiking (Drønen *et al.*, 1998). This phenomenon could be explained by volatilization or absorption of Hg in soil, which could reduce the Hg bioavailability, therefore decreasing the Hg selective pressure.

Experiments based on chronic Hg exposures showed an enrichment of Hg resistant bacteria but no correlation between Hg and VHB population (Muller *et al.*, 2001; Ruggiero *et al.*, 2011). The effect of Hg on the number of VHB and Hg resistant bacteria is well described in the literature in response to an acute Hg exposure, showing that the number of VHB tend to level off when the Hg resistant bacteria number tend to rapidly increase, while chronic Hg exposure effect on bacterial community remains less studied.

### 1.4.3.2 Molecular methods

As described for fungi, scientists used relatively recent molecular methods to decipher changes in bacterial soil communities due to Hg exposure. The study of Bressan et al. (2008) followed the evolution of the soil bacterial communities after various minor perturbations (CuCl<sub>2</sub> 50 mg/kg DM; herbicide atrazine 1.5 mg.kg<sup>-1</sup> DM or heat shock 35 °C for 48h) and a more severe perturbation with 100 HgCl<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup> DM of soil. To do this, they used the Bacterial Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (B-ARISA) and found that HgCl<sub>2</sub> addition indeed resulted in a severe perturbation of the bacterial community structure. In addition, the study showed that Hg spikes affected less the bacterial community if it was previously exposed to a minor stress. As this effect was observed for the three minor perturbations, the authors hypothesized that a generic response occurred at a community level and no metal tolerance selection was particularly involved at a community level. They proposed a schematic representation of the dynamic of soil bacterial communities exposed to minor perturbations or/and Hg stress (Figure 41).

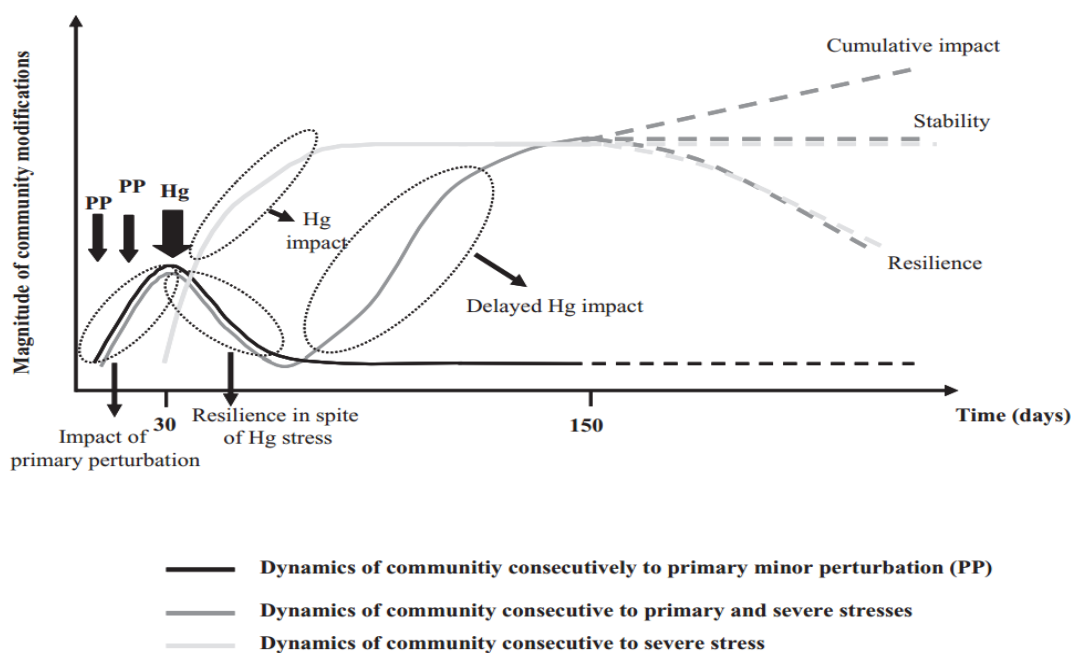


Figure 41 : Schematic representation of the bacterial community response to successive minor perturbations and severe stresses (Bressan *et al.*, 2008).

To determine the effect of Hg spiking on soil ammonia-oxidizing bacteria (AOB) community, real-time PCR assay of the *amoA* genes were used (Liu 2009). They showed that the AOB community richness decreased with increasing Hg concentrations in soil, the half-maximal effective concentration (EC<sub>50</sub>) being 1.59 mg/kg dry soil. Liu et al., (2014) followed the bacterial molecular biomass with 16S qPCR, along a long-term Hg gradient and showed no correlation with THg. Conversely, it was remarkably positively correlated with MeHg under a

chronic Hg exposure (Liu et al., 2014), although MeHg is known to be one of the most toxic forms of Hg (Mahbub *et al.*, 2017). However, MeHg can be very toxic for the other soil ecological guilds such as fungi or protozoa, which are potentially in interaction with bacteria. This positive effect of MeHg on bacterial molecular biomass could be an indirect effect of changing interactions between ecological guilds in soil, in favor of bacteria for example in changing the prey-predator dynamic between bacteria and protozoa (Holtze et al., 2003). The effect of Hg on the interactions in the soil microbiome is not well understood.

Using HTS technologies such as Illumina MiSeq, few studies have attempted to compare bacterial communities under chronic Hg exposure in the environment. A study on a Hg enriched perturbed soil of a chlor-alkali tailing dumps revealed a clear dominance of *Gammaproteobacteria* from the *Pseudomonas* genera (Zappelini *et al.*, 2015). A second study at the same chlor-alkali site had allowed for the isolation of Hg resistant *Pseudomonas*, although the HTS analysis revealed that bacteria from the *Chloroflexi* phylum were dominating the soil community (Durand submitted). This phylum takes advantage of the oligotrophic environment such as caves, and in TE-contaminated soil, suggesting that this phylum is abundant in extreme conditions (Lopez et al., 2017). An experiment using Illumina MiSeq to follow the bacterial community structure and diversity has been carried out on spiked soil with various HgCl<sub>2</sub> concentrations and soil types (Mahbub *et al.*, 2016b). After a 90 day-exposure period, results revealed an increase in the abundance of bacteria from the proteobacteria phylum and from other unclassified groups. Moreover, Hg was a major disturbance that had a negative impact on ammonium oxidizers and nitrifiers. A low concentration of soil Hg (between 4.4 and 11.1 mgTHg.kg<sup>-1</sup> DM) lead to a statistically significant decrease of 20 % of the bacterial diversity. The decrease of alpha diversity was correlated with Hg concentrations in neutral and alkaline lower organic carbon containing soils but not for rich organic carbon containing acidic soil, which contain less water soluble Hg. In addition, water soluble Hg, determined with de-ionized water extraction (Mahbub *et al.*, 2016a), leads to change on the bacterial alpha diversity at lower concentrations ranging from 3.8 to 22.8 µg Hg<sup>2+/1</sup> and could be an informative indices for bioavailability of Hg in soils.

#### **1.4.4 Fungal mechanisms related to Hg exposure**

Microorganisms are ubiquitous, and have been exposed to all types of pollutants. The selective pressures from a metal-containing environment have led to the development of resistance systems to virtually all toxic metals for bacteria (Bruins *et al.*, 2000) or fungi (Bellion *et al.*, 2006). Autonomous cells have developed a wide variety of mechanisms to maintained



homeostasis in a highly concentrate metal environment: extracellular chelation by excreted ligands, cell-wall binding, enhanced efflux, intracellular chelation or subcellular compartmentation. The effects of inorganic form of Hg on the cellular processes have been previously reviewed (Mahbub et al. 2017). In details, dehydrogenase activity, urease production, nitrification, ATP production, total microbial population, total nitrogen fixers, microbial biomass carbon, alkaline phosphatase, methane oxidation and respiration are somehow affected by Hg exposure. Microbial resistance mechanisms to Hg are not fully understood, although some mechanisms have been proposed: (i) cell wall binding, limiting uptake Hg (Kinoshita et al. 2013), (ii) production of thiols (such as glutathione) to chelate Hg in sulfhydryl groups (SH) limiting its availability (Wu and Wang 2014) and (iii) the biovolatilization systems implying mercuric reduction and methylation (Urík et al. 2014; Lu et al. 2016). After a short update on bacterial mechanisms, we will focus on fungal mechanisms.

#### 1.4.4.1 Lessons learnt from bacteria

Researches related to Hg and bacteria have produced 3 times more publications than those on fungi (Figure 42).

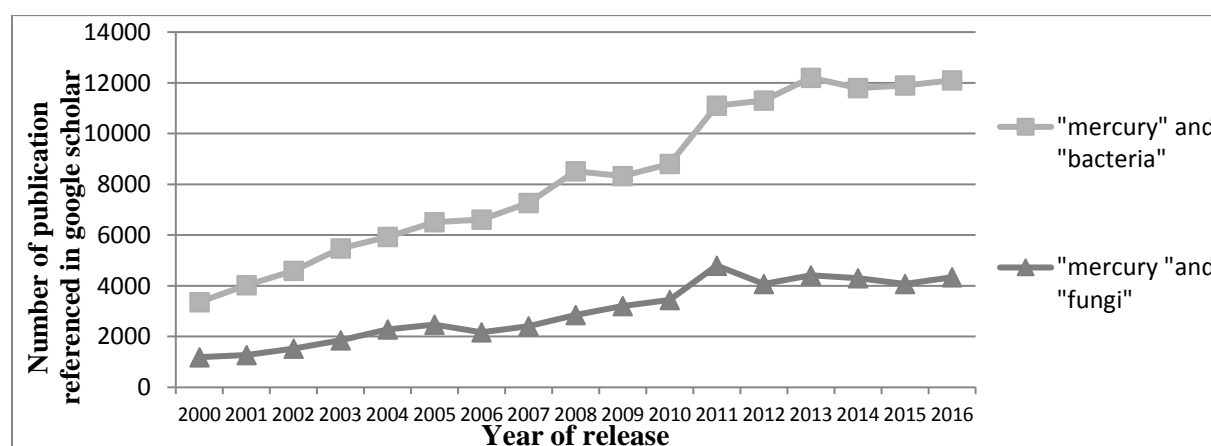


Figure 42 : Number of publications referenced in Google Scholar since 2000 on Hg for bacteria or fungi.

The Hg resistance biovolatilization systems by bacteria have attracted many researchers. The most studied example of biovolatilization in the environment takes place during the polar spring in the arctic region. The process is known as atmospheric Hg depletion events (AMDEs). Along the year, Hg(II) wet and dry deposition occurred and in the summer after snow and ice have melt, water carry Hg(II) into lakes were it could be re-emitted by Hg resistant bacteria that can volatilized Hg(II) in Hg<sup>0</sup> as a resistance system (Steffen *et al.*, 2008; Lescord *et al.*, 2015).

The best understood biochemical mechanism of Hg bacterial biovolatilization involves the Hg(II) reduction to volatile Hg(0) by inducible mercuric ion reductase coded by the *mer* operon (Dash & Das, 2012). It includes genes that encode the functional proteins for regulation (*merR*), transport (*merT*, *merP* and/or *merC*, *merF*) and reduction (*merA*) (Nascimento &

Chartone-Souza, 2003). The additional *merB* genes (coding for organomercurial lyase) are required to confer resistance to many organomercurials, such as MeHg and phenylHg, by hydrolyzing the R-Hg bond before Hg<sup>2+</sup> reduction.

In general, the additional *merB* genes are found downstream of the *merA* gene in the *mer* operon (Osborn *et al.*, 1997). The detection of *merA* was mostly found in bacteria from the subsurface (Oregaard & Sørensen, 2007) and water (Moller *et al.*, 2014) environments. Thus, the importance of microbial processes for Hg volatilization in comparison to abiotic transformation in the Hg global cycle has been questioned. In the aquatic system, experiments have showed that biotic-light-dependent transformation of Hg<sup>2+</sup> in Hg<sup>0</sup> accounted for an average of 30% of the total natural transformation, while photochemistry contributed to 30% and low-light production accounted for 40%. Recently, it was suggested that the cyanobacterial genera *Synechococcus* and *Aphanizomenon* were the first source of marine Hg emission by the transformation of Hg<sup>2+</sup> to Hg<sup>0</sup> (Kuss *et al.*, 2015). In terrestrial environments the landscape characteristics, such as the density of the vegetation, are the major drivers of the balance between reemission and sequestration of soil Hg into the atmosphere (Eckley *et al.*, 2016).

Research is also exploring other bacterial adaptation mechanisms to Hg exposure through chemical transformation. Indeed, microbial Hg methylation transforms a toxic trace metal into the highly volatile and bio-accumulated neurotoxin MeHg with rapid transfer into the food webs. Moreover, a balance exists between anaerobic methylation and demethylation of inorganic Hg by microorganisms, influencing net MeHg production in anoxic water and sediments (Lu *et al.*, 2016), hence a growing interest for methylation and demethylation in microorganisms. In soils, the best known contributors to methylation were found to be the sulphate-reducing bacteria (SRB) (Holloway *et al.*, 2009), while iron-reducing bacteria (IRB) coexisting with SRB were involved for the methylation process in the freshwater environment (Yu *et al.*, 2012). Although some bacteria taxa are known to be capable of methylation and demethylation in anaerobic condition for few decades (Pak & Bartha, 1998), the lack of a genetic marker for microbial MeHg production has prevented a non-culture dependent understanding of Hg-methylating organism distribution in nature. Recently, it has been confirmed that a specific gene cluster (*hgcAB*) (Parks, 2013) was linked to Hg methylation by directly measuring MeHg production in several bacterial and archaeal strains encoding *hgcAB* (Gilmour *et al.*, 2013). Since then, many species have been defined as MeHg producer, including sulfate and iron-reducing bacteria, but also methanogens, syntrophic, and acetogenic bacteria, or fermentative *Firmicutes* (Gilmour *et al.*, 2013; Figueiredo *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2016). Recently, Lu *et al.* (2016) isolated the strain *G. bemidjiensis* *Bem* that has the capacity

to mediate the three main mechanisms related to Hg: Hg(II) reduction, Hg(0) oxidation, and MeHg production/degradation under anoxic conditions. Another research team studied macrophyte floating roots considered as hotspots for MeHg production in aquatic ecosystems through microbial activities (Gentès *et al.*, 2017). They showed that Hg methylation is a strain-specific process for 15 sulfate-reducing bacterial strains related to the *Desulfovibrionaceae* family.

#### 1.4.4.2 Fungi as terrestrial Hg hyperaccumulators ?

A long history of ecological survey of Hg concentration in edible and non-edible mushrooms revealed that many fungi are bioaccumulating large amounts of Hg in the environment (Kalac & Lubmir, 2000) and some fungi could be considered as hyperaccumulator of Hg, as depicted in (Figure 43). Indeed mycorrhizal fungi of the *Boletaceae* family such as *Boletus edulis* can reach an uptake of  $9.9 \pm 2.7 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ DM}$  with a bioconcentration factor (BCF), of 250 considering the low concentration of Hg in the soil of the Borecka Forest in Poland (0.005 to 0.096  $\text{mg.kg}^{-1} \text{ DM}$ ) (Falandysz *et al.*, 2002). The BCF is defined as the ratio between THg concentration in fungi and THg concentration in soil. In this same fungal family *Boletus pinophilus* or *Boletus aereus* reach even higher BCF, of 491 and of 425 respectively (Melgar *et al.*, 2009). Other studies also measured high Hg BCF for the *Agaricus* genus up to 365 for *Agaricus macrosporus* and reaching the remarkable Hg uptake of  $95 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ DM}$  for the lawn decomposer *Agaricus comtulus* found in the area of Helsinki. Other genera such as *Lepista*, *Lycoperdon* and *Macrolepiota* showed Hg hyperaccumulation in the environment.

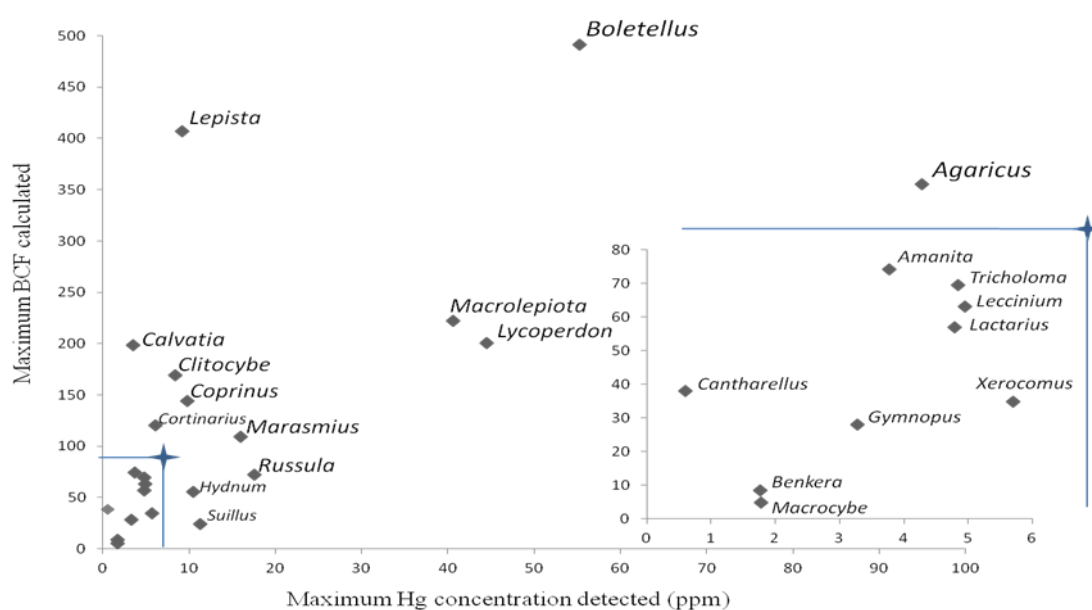
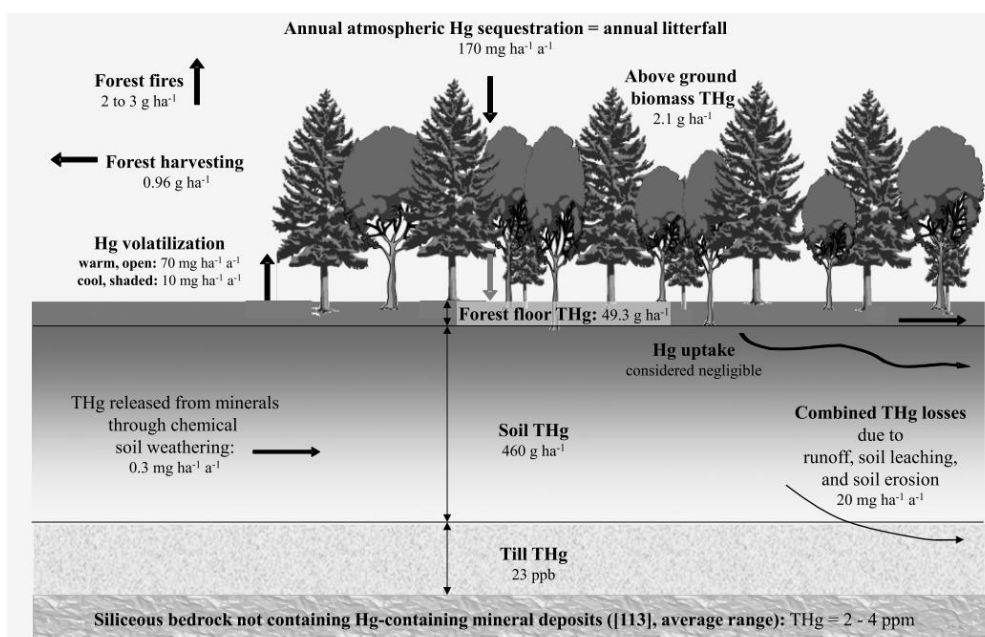


Figure 43 : Comparison between maximum Hg concentration and maximum Hg bioconcentration factor (BCF) of macrofungi reported in the literature. Smallest values are represented in details on the right. References: (Laaksovirta

& Lodenius, 1979; Minagawa *et al.*, 1980; Kojo & Lodenius, 1989; Svoboda *et al.*, 2000; Demirbas, 2001; Falandysz & Bielawski, 2001; Falandysz *et al.*, 2001, 2002; Cocchi *et al.*, 2006; Chudzyński *et al.*, 2009; Melgar *et al.*, 2009; Nasr & Arp, 2011, 2016; Jarzyńska & Falandysz, 2012; Giannaccini *et al.*, 2012; Rieder & Frey, 2013; Falandysz & Borovička, 2013; Dryzalowska & Falandysz, 2014; Falandysz, 2014; Wiejak *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015; Saba *et al.*, 2016).

Thus some fungi have been proposed to be bioindicators for Hg pollution such as *Agaricus arvensis*, *Agaricus campestris*, *Agaricus edulis*, *Agaricus haemorrhoidarius*, *Agaricus xanthodermus*, *Amanita rubescens*, *Amanita strobiliformis*, *Coprinus comatus*, *Lycoperdon perlatum*, *Marasmius oreades* and *Mycena pura* (Mejstrik & Lepsova, 1993; Wondratschek & Röder, 1993). Due to their high BCF several Boletaceae could be added to the list such as *Boletus edulis*, *Boletus pinophilus* and *Boletus aereus* (Figure 5).

Obviously, THg content in the soil should influence the BCF of Hg in fungi. Thus, a recent study proposed to survey the BCF of 15 saprotrophic and wood-rotting fungal strains grown in semi-natural medium enriched with an Hg gradient from 0 to 20 mg.kg<sup>-1</sup> DM to measure the translocation rate. Results showed that the BCF decreased with the increase of Hg in the substrate, whereas the THg in the biomass rose with the Hg content in the substrate (Gabriel *et al.*, 2016). It has been previously highlighted that macrofungi can accumulate metals despite low metal concentrations in soil, whereas vascular plants are essentially accumulating metals from metal-enriched soils (Falandysz & Borovička, 2013). Furthermore, while there is translocation of Hg between the myceliated soil and the fruit body of fungi, it has been shown that there is only a low translocation ratio from soil to aerial parts of plants through root system. The bioaccumulation of Hg measured in leaf occurred mostly by atmospheric pathway and litterfall would represent a new Hg input to terrestrial ecosystems (Ericksen *et al.*, 2003; Assad *et al.*, 2015). In the terrestrial environment, in the current state of research, fungi are probably the strongest bioaccumulating organisms for Hg and the total Hg distribution in the vegetal cover of a forest area showed variations of accumulation among the various components of the ecosystem as followed: Peas, rosehips < tree leaves (early summer) < leaves (flowering plant) < apple blossoms < berries < twigs < shrub leaves < sedge < needles (average) < ferns < aquatic vegetation < grasses < bark < liverwort < mosses < tree fungi < lichens < saprophytic fungi < ectomycorrhizal fungi (Nasr & Arp, 2016) (Figure 44).



**Figure 44 :** Synthesis of THg pool sizes and related input/output rates for forest biomass, forest floor and mineral soil pertaining the case-study based benchmark evaluation for temperate forests on till-derived soil parent materials (Nasr and Arp 2016).

Several factors have been studied for a better understanding of Hg bioaccumulation in fungi. The Hg content of higher fungi appeared to be species-dependent and varied as a function of the fungal tissues, altogether the cap containing more Hg than the stalk. Hg concentration is also affected by the development stage of the fruiting bodies, and for some fungi decreasing during the senescence (emergence > maturity > senescence) (Nasr *et al.*, 2012). In addition, a study showed in details that litter decomposing mushrooms accumulated Hg and MeHg at higher concentrations than other fungi such as ECM and wood decomposer (and also earthworms) (Rieder *et al.*, 2011). The mean MeHg contents of the fungi were 5 % of the THg content, while MeHg was four times more concentrated in earthworms reaching around 8% of the THg in the biomass. This research brought evidences that no satisfactory correlations exist between THg content in soil and Hg in the fungal (or in earthworms) biomass excepted for *Russula nigricans* showing a strong correlation ( $r^2 = 0.92$ ;  $p < 0.01$ ;  $n = 5$ ). Contradictory results showed that the total Hg content of fungi was positively correlated to the Hg bioavailability in the myceliated soil and substrate type (wood, forest soil, mineral soil) (Nasr & Arp, 2011), moreover, it was also previously highlighted that metal bioaccumulation in fungi was primarily influenced by species differences, and then by soil factors (Leyval *et al.*, 1997). This means that some fungi are good bioindicators of the Hg environmental contamination and that it is essential to correlate fungal biomass Hg with Hg in the myceliated soil. Moreover, environmental variables such as pH, temperature, and geological properties may also affect the Hg uptake by organisms (Boening, 2000). It was showed that total Hg content in fungi was negatively

correlated to total sulfur concentration in the myceliated soil and positively correlated to total sulfur content in fungi (Nasr & Arp, 2016). Those results implied that Hg binding to organic matter mitigate Hg accumulation in fungi.

Nevertheless, reader should keep in mind that atmospheric Hg deposition can also be sources of fungal contamination, at least under certain climates. Indeed, Hg accumulation was found in fungi of the Gongga Mountain in China, where absence of industrial activities, urbanization and Hg ore deposits suggested deposition as the major source of elevated Hg observed. For instance, 3,285 mg.kg<sup>-1</sup> DM of THg were detected in the cap of *Gymnopus erythropus* originating from this area. The Gongga Mountain has its own microclimate, a 'circum-polar' climate and hence is sensitive to contamination by persistent pollutants that are trapped by cold temperature and wet precipitation (Falandysz *et al.*, 2014). Thus, BCF of Hg should also take in consideration the potential risks of atmospheric Hg deposition. Moreover, determination of bioaccumulation factors (BAF), defined as the ratio between THg concentration in the fruiting body of the fungi and the **bioavailable** Hg concentration in the soil, could be a better indicator for Hg uptake by fungi but requires bioavailable Hg to be determined.

In any case, the species appeared as one of the major drivers of Hg accumulation in fungi and some of them behave like Hg sponge in the terrestrial environment. Beyond the potential threat of hyperaccumulating edible mushrooms, even in low Hg concentrated soils, the specific mechanisms leading to Hg accumulation and resistance of fungi remain fairly undiscovered. So far, remarkably little interest has emerged in the literature on the understanding of fungal mechanisms.

#### **1.4.4.3 Hg tolerance mechanisms in fungi**

The fungi present elevated Hg bioaccumulation factors despite low Hg concentrations or bioavailability in the soil, and the question on how do they manage to resist Hg toxicity arises. Indeed, fungi show resistant to TE at ranges far superior to those measured for bacteria (Rajapaksha *et al.*, 2004). In addition, due to their notorious capacity to degrade organic compounds in the upper soil horizon, they may play a role in the equilibrium between methylated and non-methylated Hg compounds in the soil, such as MeHg, which has been recognized as the most toxic Hg compound (Clarkson & Magos, 2006). Mercuric cations have a high affinity for sulfhydryl (SH). Because almost all proteins contain SH groups or disulfide bridges, mercurials can disturb almost any function that involves critical or unprotected proteins (Aschner *et al.*, 2006). In the fungal kingdom it has been assumed that accumulation and

transport of Hg could depend on production of proteins named thiols, rich in SH groups carried by cysteines (Stijve & Besson, 1976). Phytochelatins (PS) thiols are known to take parts for detoxification of Cd and Hg in plants and heterologous expression of the PC transporters AtABCC1/AtABCC2 had successfully increased TE tolerance in *S. cerevisiae* (Park *et al.*, 2012). PCs were discovered in *Saccharomyces pombe*, however the only PC complexes identified *in vivo* were with Cd, Ag, and Cu ions (Cobbett & Goldsbrough, 2002). In addition, in most fungi there is a general lack of PC response to Cd (Bellion *et al.*, 2006), thus PC seems not to be central for Cd or Hg detoxification in fungi. Among thiols, metallothioneins (MT) and glutathione (GSH) chelators are produced by fungi (Khullar & Reddy, 2016). MT proteins are also found in bacteria, plants, and eukaryotic species. They are of low molecular weight (6–7 kDa) and of the 60 amino acid residues, 20 are cysteine (Aschner *et al.*, 2006), while GSH is a non-protein thiol abundant in fungi and yeast cells (up to 10 mM), they have a very low redox potential and multiple functions in the cell such as the maintenance of mitochondrial structure, membrane integrity, and in cell differentiation and development (Pócsi *et al.*, 2004).

It has been proven that there is a strong correlation between the amount of SH groups of fungal proteins and Hg content in fungi (*Agaricus*), while almost no correlations for other metals like Cd, Al, Cu, Mn, Fe and Zn were found (Kojo & Lodenius, 1989) (Tableau 13):

**Tableau 13 : Risk levels of correlations between SH- and metal contents of fungi. A= whole material, L= fruiting bodies growing on lawns, F= fruiting bodies growing in forests. 0:  $p < 0.1$ , 1:  $p < 0.05$ , 2  $p < 0.01$ , 3:  $p < 0.001$  (calculated as if the values were normally distributed). TSH: total -SH, NPSH: free -SH, PSH: protein bound -SH (Kojo & Lodenius, 1989)**

	Hg	Cd	Al	Cu	Mn	Fe	Zn
TSH	AF 13	F 2	F -0				
NPSH	AF 13	F 1					L -2
PSH	AF 12	F 1	F -1	A 0			
Hg	—	ALF 323	L 2	A 3	A 0	A 1	
Cd		—	AL 01	AL 31	F -0	A 1	AF 11
Al			—			ALF 333	
Cu				—		AL 31	ALF 111
Mn					—	A 1	F -1
Fe						—	
Zn							—

The production of MTs as a reaction to HgCl<sub>2</sub> exposure was demonstrated for rats (Piotrowski *et al.*, 1974) and was found to form complexes with other metals such as Cd, Cu, Zn (Pedrero *et al.*, 2012). The binding of Hg to SH groups has also been demonstrated in synthetic conditions with thiolated multi-walled carbon nanotubes exposed to Hg contaminated wastewater and conclusions showed that the Hg(II) ion adsorption was exothermic,

spontaneous and physisorption in nature (Hadavifar *et al.*, 2014). Moreover, the same study found a positive correlation between catalase and Hg content which could be explained by Hg vapor oxidation by the catalase activity (Magos *et al.*, 1978). In addition, low molecular weight thiols seemed to facilitate TE transport in mammal's body (Bridges & Zalups, 2010). Thiol production in response to the Hg exposure could be widespread in organisms and could be important for fungal transport and resistance mechanisms.

Moreover, the thiolate-Hg complexation is of capital importance because the number of Hg-ligated thiolates influenced its binding to carbon (Miller, 2007), thus the Hg toxicity could be influenced by fungi. Indeed, the toxicity of Hg compounds is dependent of the ability to release its most toxic form  $\text{Hg}^{2+}$ , which has high affinity for other cellular ligands. Moreover, it has been found that compounds providing two or three thiolate ligands activate organomercurials for cleavage. A study showed that arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) enable the uptake of Hg-tetra-thiolate complexes in plants grown on Hg enriched soils ( $50 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ DM}$ ), while non AMF plants Hg is forming di-thiolate and di-amino complexes. Moreover this process was AMF density dependent, showing that AMF can modify the Hg binding environment in plant roots (Kodre *et al.*, 2017). Thus, in the soil where Hg can have extremely stable bindings with the carbon of organic matter, the thiolates production by fungi may greatly impact the bioavailability of Hg from the organomercurial forms. Consequently the concentrations and potential toxicity of Hg in soil may be affected by the fungal communities. Moreover, the Hg resistance of some fungi could depend of the ability of those organisms to modify the Hg binding environment by SH groups to immobilize the Hg in a non-toxic form.

Otherwise, in a soil Hg contaminated environment fungi could have the potential to detoxify Hg compounds by volatilization. Some fungi, such as *Yarrowia* strains, have been proven to be Hg(II) removal agents, reduced into  $\text{Hg}^0$  (Gadd, 2007; Oyetibo *et al.*, 2015). In addition, fungi may also have an important Hg methylation potential, although much less studied than in bacteria. It has been demonstrated that *Aspergillus flavus* could remove 98 % of Hg from a liquid growth media enriched with  $10 \text{ mg.l}^{-1} \text{ HgCl}_2$  and the authors concluded on the biosorption or bioimmobilization potential of the fungi (Kurniati *et al.*, 2014). However, the experimental procedure did not include measures of Hg in the fungal biomass or volatile Hg compounds emitted, but only measured Hg amount remaining in solution, thus volatilization could not be excluded. A study proposed a similar experiment with several fungi and this time Hg was measured in the fungal biomass (Urík *et al.*, 2014). They concluded that bioimmobilization of Hg was negligible compared to volatilization and they emphasize the



biovolatilization potential of *Aspergillus niger* and *Cladosporium cladosporioides*, which reached 80 % of  $32.7 \text{ mg.l}^{-1} \text{ HgCl}_2$ . In such experiment, we proposed that the survey of Hg volatile compounds such as MeHg should be done to exclude the bioimmobilization hypothesis. Researches on fungal and bacterial MeHg production from  $\text{HgCl}_2$  exposure have been carried out in the past (Vonk & Sijpesteijn, 1973). They revealed that *A. niger*, *Scopulariopsis brevicaulis* and *S. cerevisiae* are able to produce MeHg from sub lethal  $\text{HgCl}_2$  concentrations. MeHg was essentially found in the mycelium contrasting with bacteria where the MeHg produced was mostly found in the media. For *A. niger*, studies agreed on the media detoxification capacity of the fungi but not on the fate of the Hg.

Environmental conditions required and mechanisms involved in Hg volatilization, bioaccumulation or bioimmobilization by fungi need to be clarified. The Hg fate in fungal cells has been poorly studied in the past when compared with other metals, however natural biosorbents, which have the capacity to bioconcentrate metals through biosorption, raise scientists' interest for their potential cost-effectiveness to remediate environmental aqueous pollutions (Kumari & Abraham, 2007; El-Morsy *et al.*, 2013; Pandit & Majumder, 2014; Vijayaraghavan & Balasubramanian, 2015). Indeed, TEs cannot be degraded in the environment and the first barrier against their toxicity for living organism is the cell membrane. Thus, in the fungal kingdom, most researches focused on the biosorption of the yeast *S. cerevisiae* (Wang & Chen, 2006). A study evaluated the factors affecting the biosorption of MeHg and Hg(II) by *S. cerevisiae* (Madrid *et al.*, 1995). The results showed that MeHg bound easily to the yeast cell in a wide range of pH and temperature compare to Hg(II), which were less effectively bound to the cells. The slow Hg(II) uptake was following the Michaelis-Menten kinetics for 24h implying saturation of binding sites or transports. The explanation proposed here for the rapid bound of MeHg was that the yeast was able to rapidly reduce  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  to other more volatile Hg species such as Hg(I) or  $\text{Hg}^0$ . In addition, among various ions the chloride ion in high concentration was strongly increasing the binding of Hg(II). When concentration of metals is higher in the extracellular compartment than in the cell, metals can be accumulated inside the cell through diffusion or piracy of other transport channels. To decipher the blur mechanisms of metal uptake by *S. cerevisiae* researchers have compared the biosorption capacity of *S. cerevisiae* in different forms such as living cells, dead cells, inactivated cells, free cells and they revealed that the vacuole was involved for detoxifying Zn, Mn, Co, Ni, but not for Cu and Cd (Wang & Chen, 2006). In the literature, information on the uptake or subcellular compartmentation of Hg in fungal cell is scarce. However, recent work found a putative

transport system for Hg (HgCl<sub>2</sub>) in *S. cerevisiae* and explores subcellular compartmentation in the higher fungi *Podospora anserina* (Durand to be submitted).

Molecular methods could lead to new insights for cell mechanisms induced by an Hg stress. A transcriptomic approaches were carried out on *Elodea nuttallii* (aquatic plant) exposed to various acute Hg exposure and determined up-regulated genes (Regier *et al.*, 2013). Results showed an up-regulation of sugar-catabolizing enzymes in agreement with the decrease of sugar and protein contents expected when exposed to toxic metals. There was also induction of heat-shock proteins known to contribute to metal tolerance in plants. Genes down-regulated were related to 'homeostasis of metal ions', 'heavy metal ion transport' and genes related to 'detoxification not related to metallic detoxification'. Another significant work used the suppression subtractive hybridization (SSH) technique to identify the genes differentially expressed by the strikingly Hg resistant *Trichoderma harzianum* IMI 393899 grown in the presence of HgCl<sub>2</sub> compare to growth with Cd (Puglisi *et al.*, 2012). All of the 8 genes identified as up-regulated after HgCl<sub>2</sub> exposure was also up-regulated by Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and among them a possible role in the tolerance has been predicted for hydrophobin. Hydrophobins are a group of small cysteine-rich proteins only expressed by filamentous fungi and have the ability to dissolve hydrophobic molecules into aqueous media. Thus the authors proposed that the hydrophobins could be involved in the retention of Hg in the cell surface leading to an improved Hg resistance. Similarly, Muller *et al.* (2007) have suggested the role of hydrophobins in zinc resistance for *Suillus luteus*, whereas other studies showed that this taxon could accumulate Hg from the environment (Minagawa *et al.*, 1980; Falandysz *et al.*, 2001; Saba *et al.*, 2016). We could suggest that such molecular approaches may unravel fungal mechanisms involved in acute or chronic exposure to Hg.

#### **1.4.5 Conclusions**

Environmental contamination caused by Hg release is a serious problem worldwide due to its toxicity to most organisms. Thereby, understanding its impact on biological compartments is needed especially for microorganisms, which have many interactions with Hg compounds in both terrestrial and aqueous environments. Indeed, studies of the bacterial and fungal communities revealed that some species can accumulate, transport and transform Hg in the environment, but knowledge on fungal mechanisms involved is still scarce. Concerning fungi few published data are available as compared to bacteria, while many ecological phenomenons are related to their activity, especially in the terrestrial system. In this review, we highlighted the following facts:

- Among TE, Hg is one of the most toxic element for both fungi and bacteria in axenic culture;
- Fungi are globally more tolerant than bacteria to TE in the environment and Hg probably affect more the bacterial communities than the fungal communities in the soil;
- The fungal genus *Trichoderma* and especially *Trichoderma harzianum* species is highly resistant to Hg, while the bacteria phylum *Chloroflexi* is dominant in TE and Hg contaminated soil;
- Bioavailability of Hg in the soil is a key factor to determined Hg toxicity in the environment, and is related to organic matter and total S content of the soil;
- Fungi are the biological compartments accumulating the largest amount of Hg and MeHg in forest ecosystem; this accumulation of Hg is species dependent, and litter decomposing fungi are bioaccumulating higher concentration than ECM or wood decomposing fungi;
- Thiols play a central role for detoxification of Hg in the fungal cells and the Hg-carbon binding is also dependent of the thiolate-Hg complexation;
- Some fungi have the potential to detoxify organomercurials by volatilization, however more studies are required;
- Detoxification of Hg contaminated aqueous environment by fungi and yeast have been studied, nonetheless, knowledge is scarce on the mechanisms of bioaccumulation and bioimmobilization



# Chapitre 2

---

bacteries (2) champignons (4) communautes (4)  
conditions (2) contamination (2) cycle (3) ecosysteme (2) ecosystemes (2) etudes (2)  
**hg** (13) industrielle (2) ligneux (2) mecanismes (3) microbiennes (2)  
**microorganismes** (9)  
objectif (5) phyllosphere (2) phytomanagement (2) plante (2)  
plantes (4) pollues (2) populus (2) projet (2) proprietes (2) racines (2) sites (3)  
sol (2) sols (2) these (5)

*Analyse sémantique du chapitre 2*



## 2. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Les propriétés très particulières du Hg en ont fait un élément chimique prisé depuis très longtemps et son utilité dans de nombreux procédés chimiques en ont fait une ressource abondamment utilisée depuis l'ère industrielle. Cependant, parmi les ETMs, le Hg est un des métaux les plus toxiques pour la biosphère et son utilisation par l'Homme a entraîné la contamination très localisée de certains écosystèmes en France et dans le monde. La problématique de remédiation de ce contaminant sur les sites et sols pollués est toujours d'actualité et en fait une des priorités pour les autorités. Le phytomanagement de ces sites et sols pollués est une méthode peu coûteuse et qui rend de nombreux services écosystémiques comparé à des méthodes non biologiques souvent destructrices des écosystèmes persistant sur les sites. Cette thèse s'inscrit en partie dans le projet EC2CO FREIDI-Hg (Favoriser la Réduction des Emissions *in-situ* par la Dendromasse : cas de l'Interception du Hg) débutée fin de l'année 2014 au sein du laboratoire Chrono-environnement de Montbéliard. Son objectif est d'identifier le rôle des communautés microbiennes inféodées au peuplier dans le cycle du Hg sur un site contaminé en éléments traces (Figure 45). Les postulats de départ sont que les bactéries telluriques sont capables de volatiliser le Hg sous forme inorganique ainsi que les champignons qui l'absorbent de manière très importante sur leur paroi. Pourtant peu d'études portent sur l'effet de ces micro-organismes sur le cycle Hg lorsqu'ils sont inféodés aux ligneux ou sur le transport cellulaire dans les microorganismes. Ce sont ces constats qui ont poussé au développement du projet FREIDI.

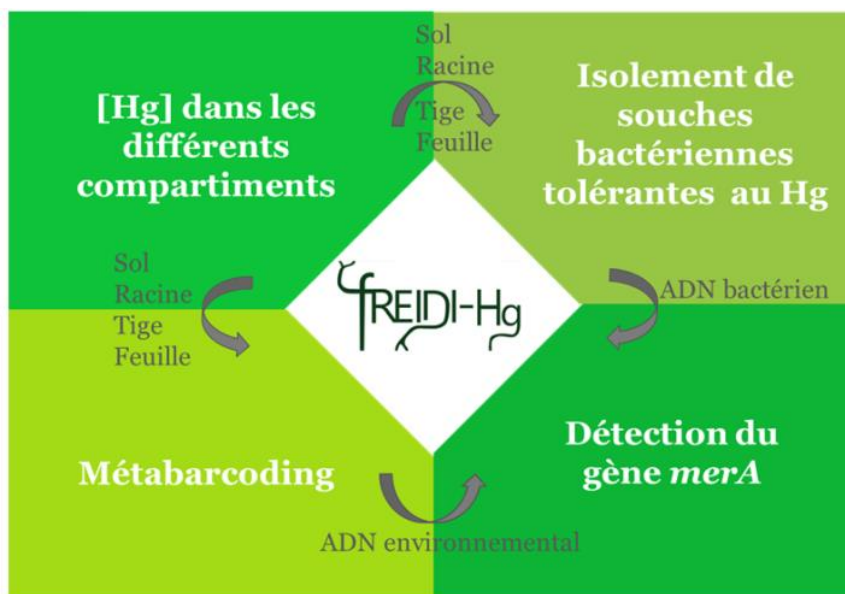


Figure 45 : Organisation des missions de FREIDI-Hg (d'après François Maillard).

Dans les conditions spécifiques d'une contamination par le Hg les plantes sont exposées non seulement par l'intermédiaire de leurs racines mais également de leur partie aérienne, or les communautés de microorganismes abritées par la phyllosphère des arbres sont peu connues. Par ailleurs, les études sur l'effet du Hg sur la structuration des communautés de microorganismes dans leur écosystème d'origine sont peu étudiées. Il en découle un premier objectif de thèse :

- Obtenir une meilleure compréhension des communautés microbiennes (champignons et bactéries) associées à la phyllosphère (feuilles et tiges) et à la rhizosphère (racines et sol) d'un ligneux (*Populus trichocarpa* x *Populus maximowiczii*) planté sur un sol enrichi en Hg (moyenne de 5,5 ppm) dans un contexte industriel, au moyen des technologies de séquençage d'ADN environnemental haut débit Illumina MiSeq.

Il est d'autant plus précieux de s'intéresser aux microorganismes associés aux plantes remédiatrices qu'il est reconnu que l'association de certains microorganismes avec les plantes utilisées dans les projets de phytomanagement améliorent leur implantation et leur croissance dans des conditions stressantes. Ces microorganismes sont dits « plant growth promoting » (PGP) et interviennent soit directement, en améliorant certains mécanismes de la plante comme par exemple sa nutrition, soit indirectement, en protégeant celle-ci des agressions biotiques et abiotiques de son environnement. Il en découle le second objectif de thèse :

- Isoler et caractériser des microorganismes résistants au Hg et qui possèdent des propriétés fonctionnelles bénéfiques pour les plantes, sur ces mêmes peupliers de la friche industrielle enrichie en Hg, étudiée lors du premier objectif.

Par ailleurs, le cycle du Hg dans la biogéosphère reste relativement mal compris et les connaissances sur les mécanismes d'accumulation et de transformation de ce métal par les microorganismes, pourtant à la base de tout écosystème, sont rares. Ceci nous amène au troisième objectif de thèse :

- Etudier les mécanismes d'accumulation du Hg dans les microorganismes et plus spécifiquement dans les champignons dont certains l'accumulent particulièrement efficacement, en utilisant des champignons modèles (*S. cerevisiae* et *Podospora anserina*).



La thèse a été organisée pour être accomplie en trois années, suivant un planning qui s'est déroulé comme présenté en Figure 46.

Années	2014		2015				2016				2017		
	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	
<b>Trimestres :</b> T1 : janvier-mars, T2 : avril-juin, T3 : août-octobre T4 : nov.-déc..													
<b>Tâches</b>													
<b>1- Caractérisation des communautés microbiennes inféodées aux parties aériennes de peupliers</b>													
Echantillonnage	■												
Mis au point de l'extraction d'ADN	■	■											
Mise au point de la purification d'ADN		■											
Metabarcoding (Bio-informatique et traitement des résultats)		■	■	■	■	■	■	■	■				
<b>2- Isolement et caractérisation fonctionnelle de microorganismes d'intérêt issus du sol et de la phyllosphère</b>													
Echantillonnage		■		■			■						
Isolement de microorganismes		■		■			■						
Caractérisation moléculaire			■	■	■	■	■	■					
Caractérisation fonctionnelle			■	■	■	■	■	■					
Préparation d'un inoculum									■				
<b>3- Inoculation en milieu contrôlé et effet sur la capacité d'interception du mercure par les feuilles</b>													
Mise au point de techniques d'inoculation									■				
Préculture de poivron									■				
Inoculation et culture de poivron										■			
Mesures physiologiques et de la biomasse + données Hg										■	■		
<b>4- Transport du mercure</b>													
Analyse des gènes candidats ( <i>S. cerevisiae</i> et <i>P. anserina</i> )							■	■	■	■	■		
<b>5- Enseignement (Monitorat)</b>													
Cours et corrections			■	■	■	■	■						
<b>6- Bilan et valorisation</b>													
Comité de thèse			■				■						
Soutenance de thèse												■	
Rédaction de manuscrits (publications et thèse)					■	■	■	■	■	■	■	■	

Figure 46 : Calendrier de thèse.



## Chapitre 3

---

**adn** (43) **adne** (13) **ama** (12) **amorces** (13) **amplification** (11)  
**anserina** (14) **atmosphere** (12) **bacteries** (28) **base** (13)  
**champignon** (21) **champignons** (10) **concentration** (21)  
**conditions** (11) **dispositif** (11) **distillee** (12) **extrait** (10) **feuilles** (26) **filtre** (10)  
**fonction** (13) **gel** (12) **gelose** (11) **hg** (96) **hgcl** (16) **incubation** (15)  
**its** (14) **levures** (17) **mesure** (16) **microorganismes** (11)  
**milieu** (43) **mycelium** (14) **otus** (11) **pbs** (17) **pcr** (32) **ph** (12)  
**poivrons** (12) **produits** (11) **proteique** (11) **puits** (11) **racines** (22) **reads** (11)  
**rpm** (10) **sequencage** (19) **sequence** (23)  
**sequences** (51) **sol** (24) **solution** (27)  
**souche** (14) **souches** (27) **tampon** (17) **temperature** (10)

*Analyse sémantique du chapitre 3*



## 3. SITE D'ETUDE, MATERIELS ET METHODES

### 3.1 Site d'étude

#### 3.1.1 Présentation de la friche industrielle de Tavaux

L'entreprise Solvay est implantée dans le Jura à Tavaux depuis 1930, la plateforme s'étend sur 200 ha et emploie 735 collaborateurs. Le procédé utilisé depuis l'installation de l'usine à Tavaux est celui de l'électrolyse du NaCl, généralement réalisé avec de la saumure de chlorure de sodium, dans ce cas les produits sont l'hydroxyde de sodium, le dihydrogène et le dichlore. On parle alors plus précisément du procédé chlore-alcali. L'entreprise transforme plusieurs centaines de milliers de tonnes de sel par an, pour produire du chlore utilisé pour la production de dérivés chlorés, et notamment le PolyChlorure de Vinyle (PVC) et Solvay est devenu l'un des grands acteurs industriels du monde, actif dans des activités chimiques, plastiques et pharmaceutiques. L'usine est classée « Seveso » seuil haut, une directive qui impose aux états membres de l'Union Européenne (UE) d'identifier les industries présentant un risque d'accidents majeurs. La directive SEVESO 3 a été votée par l'UE le 4 juillet 2012 ; elle concerne environ 10 000 sites en Europe et concerne 1171 sites en France, dont 656 seuil haut (recensement du 31/12/2014 selon les archives du ministère de l'écologie)<sup>15</sup>. Pour Solvay Electrolyse de Tavaux, le seuil SEVESO est principalement lié à des risques d'explosion et d'incendie de divers produits chimiques. Par exemple, les gaz produits doivent absolument être isolés pour éviter un mélange explosif entre Cl<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>. En juin 2014, INOVYN (co-entreprise entre INEOS et Solvay) sur le PVC et la filière chloro-vinyle est créée. L'activité liée à la production de produits chlorés est, depuis 2016, passée sous l'enseigne du groupe INOVYN. A Tavaux, c'est principalement le chlorure de sodium, issu des saumures produites dans la région environnante, qui est utilisé pour réaliser la réaction d'électrolyse. Il existe deux technologies qui permettent de réaliser l'électrolyse : (i) l'une basée sur un procédé au Hg et (ii) l'autre basée sur un procédé utilisant des membranes.

Brièvement, le principe de l'électrolyse est le suivant :

- ✓ à l'anode : les ions chlorures sont oxydés, avec formation de Cl<sub>2</sub>
- ✓ à la cathode : dans le procédé au Hg, une microcouche de Hg s'écoule de l'anode vers la cathode en suivant une légère pente, il se forme un amalgame Na et Hg avec formation dihydrogène gazeux (H<sub>2</sub>) et d'ions hydroxydes (OH<sup>-</sup>) par réaction du sodium contenu dans l'amalgame avec l'eau du décomposeur, tandis que pour les cellules à membrane et à diaphragme, l'eau se décompose pour donner du H<sub>2</sub> et des OH<sup>-</sup>.

---

<sup>15</sup> <http://archive.wikiwix.com/cache/?url=http%3A%2F%2Fwww.developpement-durable.gouv.fr%2FLa-directive-SEVESO-3-pour-une.html>

L'électrolyse à Hg (Figure 47) permet la production de  $\text{Cl}_2$  pur et de soude caustique à 50% tandis que l'utilisation de membranes implique un mélange  $\text{Cl}_2$  et  $\text{O}_2$  à l'anode donnant une production de soude caustique de moindre qualité. Cependant, pour l'électrolyse à Hg, il est nécessaire d'apporter de la saumure pure, exempte de contaminants métalliques, pour éviter la production d' $\text{H}_2$  qui peut être explosif. De plus, ce processus consomme davantage d'énergie puisque la tension doit être plus importante lors de l'électrolyse à Hg. Enfin, bien que le Hg soit recyclé, sa nature volatile et sa manutention en général génère des déchets dans l'environnement.

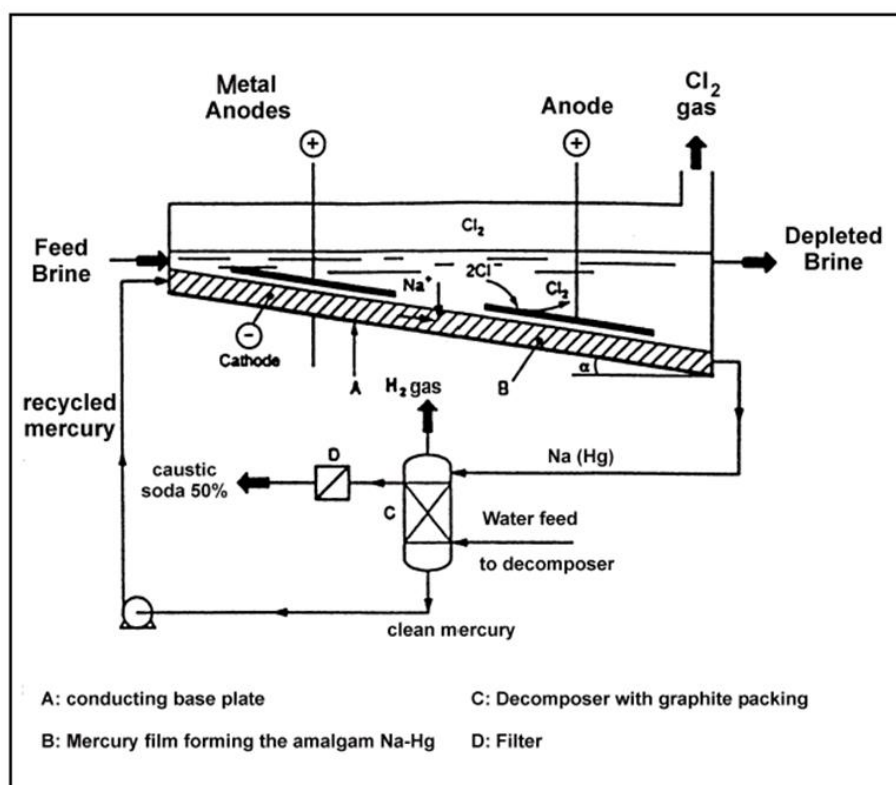


Figure 47 : Processus d'électrolyse à Hg selon L'INERIS<sup>16</sup>

Bien que la société ait adopté le procédé à membranes depuis 2010 pour la totalité de sa production, Solvay, comme la plupart des industries chlore-alcali, a d'abord utilisé le processus d'électrolyse à Hg engendrant ainsi des rejets de Hg dans l'environnement. La commune de Saint Symphorien-sur-Saône (21 : Côte d'Or) accueille les eaux usées de l'usine, via un canal partiellement couvert, qui se déverse dans des bassins de décantation. Cette étape élimine l'essentiel des polluants provenant de l'usine, cependant le Hg n'est pas éliminé à cette étape. Les eaux ainsi traitées vont finalement se déverser dans l'étang de l'Aillon qui est enrichi en Hg, en Ba et en As et qui présente un pH alcalin. Durant près de 40 ans, un curage régulier de l'étang de l'Aillon a conduit à l'accumulation de sédiments sur la lagune de 12 hectares (ha),

<sup>16</sup> [http://ied.ineris.fr/sites/default/interactive/brefca/bref\\_fr\\_ptmo.htm](http://ied.ineris.fr/sites/default/interactive/brefca/bref_fr_ptmo.htm)

elle aussi dans la commune de Saint Symphorien-sur-Saône (Latitude 47°4'52''Nord, longitude : 5° 20'14'' Est). Le dépôt de sédiment a été stoppé en 2010 et une végétation a naturellement recolonisé la lagune. C'est sur cette lagune qu'a été installé en 2011 le dispositif BIOFILTREE (projet ANR 2010-2014 géré par le LCE) (Figure 48).

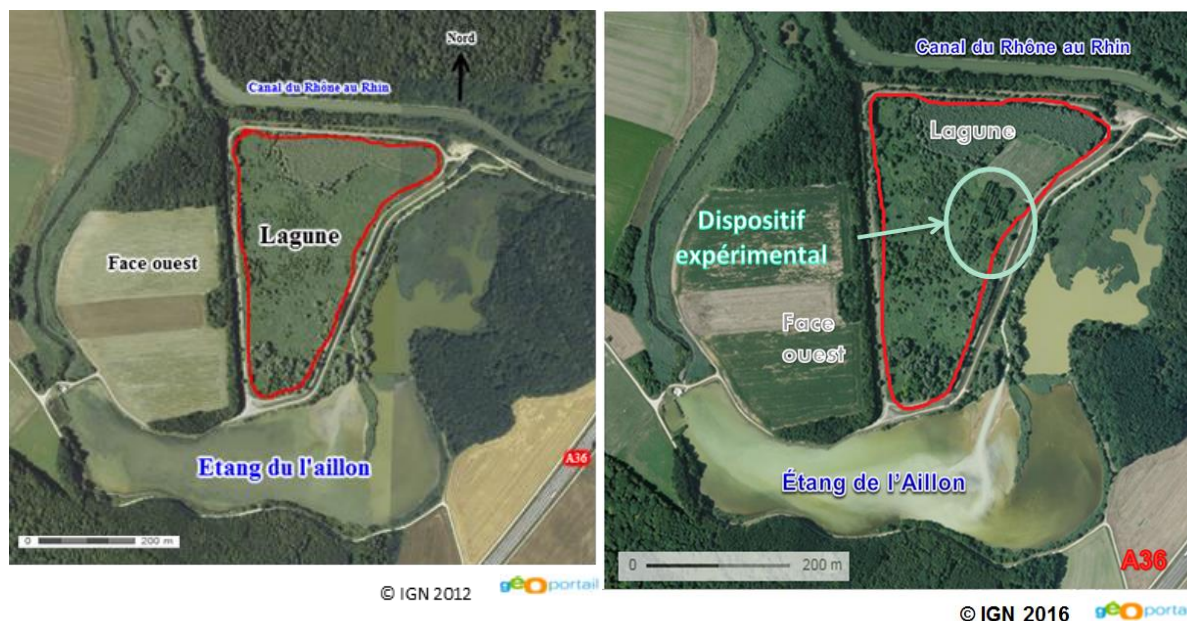


Figure 48 : La lagune de dépôts des sédiments de l'étang de l'Aillon dans la commune de Saint Symphorien-sur-Saône (Latitude 47°4'52''Nord, longitude : 5° 20'14'' Est) en 2012 (à gauche) et 2016 (à droite).

### 3.1.2 Caractéristique physico-chimique du substrat de la lagune

D'après les analyses réalisées en 2013 (SADEF, Aspach-le-Bas, Haut Rhin), le substrat est principalement constitué de limons fins et d'argiles (Tableau 14) ; il est d'ailleurs classé parmi les limons fins argileux sur la Figure 4.

Tableau 14 : Pédologie du sol de la parcelle expérimentale (Rapport d'analyse SADEF).

Argile (%)	Limon fin (%)	Limon grossier (%)	Sable fin (%)	Sable grossier (%)	Calcaire total (%)
15,63 (+/- 0,84)	79,25 (+/- 2,96)	3,58 (+/- 3,30)	0,83 (+/- 0,34)	0,75 (+/- 0,24)	63,78 (+/- 8,98)
pH eau	Matière organique (g/kg)	Carbone organique (g/kg)	Azote total (g/kg)	Rapport C/N	CEC Metson (mé/kg)
8,28 (+/- 0,04)	37,87 (+/- 5,68)	21,9 (+/- 3,28)	2,49 (+/- 0,45)	8,78 (+/- 0,36)	63,5 (+/- 7,01)
CEC pH sol (mé/kg)	Phosphore (g/kg)	Potasse (g/kg)	Magnésie (g/kg)	Chaux (g/kg)	Sodium (g/kg)
121,83 (+/- 15,50)	0,38 (+/- 0,02)	0,25 (+/- 0,02)	0,105 (+/- 0,02)	12,73 (+/- 0,05)	0,03 (+/- 0,006)

Il présente un caractère alcalin et une forte dominance du caractère calcaire du sol, avec un enrichissement en carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) particulièrement important (58 %). La teneur moyenne en Hg dans le substrat sur la parcelle expérimentale est de  $5,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  de sol sec (de 2 à  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  ont été mesurés) alors que le FPGN moyen est inférieur à  $50 \text{ ng.kg}^{-1}$  de sol sec.

## 3.2 Matériels biologiques

### 3.2.1 Peuplier (*Populus trichocarpa* x *Populus maximowiczii* / cv Skado)

La Figure 49 présente la parcelle expérimentale en photographie et un plan du dispositif initial implanté en 2011 et les parcelles ciblées lors de cette thèse.

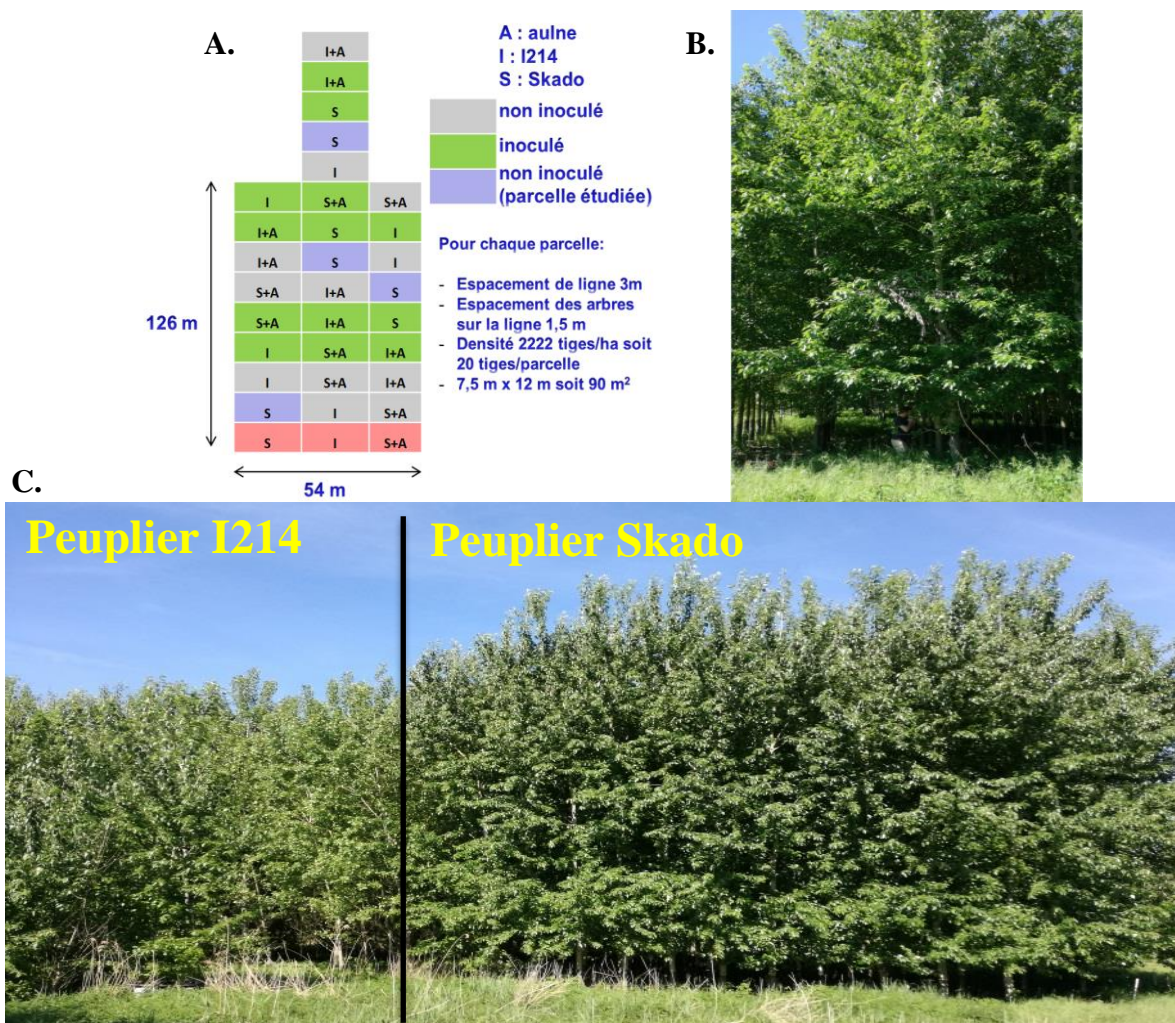


Figure 49 : A) plan du dispositif expérimental ; B) aperçu du peuplier de la variété Skado sur le dispositif expérimental en juin 2017 ; C) comparaison du peuplier I214 et du Skado sur le dispositif expérimental en juin 2017.

Le peuplier est un arbre de la famille des Salicacées et du genre *Populus* qui englobe 35 espèces. De nombreux hybrides existent tel que le cultivar Skado (cv femelle) obtenu par croisement entre les espèces *Populus trichocarpa* et *Populus maximowiczii*. Le peuplier fait partie des espèces ligneuses à croissance rapide et produit beaucoup de biomasse, en particulier le cultivar Skado (Ciadamidaro *et al.*, 2017). Il appartient par ailleurs aux plantes ligneuses modèles et sa tolérance vis-à-vis des ETMs a été largement étudiée (Pilon-Smits *et al.*, 1998; Dos Santos Utmazian *et al.*, 2007; Romeo *et al.*, 2014). Ses propriétés en font un bon candidat pour les projets de phytomanagement. Les cultivars Skado et I214 ont été plantés en 2011 sur



le site expérimental de Tavaux à une densité de 2222 tiges/ha ainsi que de l'Aulne comme espèce accompagnatrice. Ce travail de thèse n'a porté que sur le cultivar Skado. L'inoculation des plançons avec un consortium de champignons mycorhiziens a été réalisée sur la moitié des parcelles. Le consortium était composé des souches mycorhiziennes suivantes : *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198 (Agronutrition, Toulouse, France), 6 autres champignons endomycorhiziens *Rhizophagus intraradices* BEG140, *Funneliformis mosseae* BEG95, *F. geosporum* BEG199, *Claroideoglobus claroideum* BEG96, *C. etunicatum* BEG92, *Glomus microaggregatum* BEG56 (Symbivit®, Symbiom Company, ; Czech Republic), ainsi que 6 champignons ectomycorhiziens *Hebeloma mesophaeum*, *Amanita rubescens*, *Laccaria proxima*, *Paxillus involutus*, *Pisolithus arrhizus* and *Scleroderma citrinum* (Ectovit® Symbiom Company, ; Czech Republic). Le dispositif a été divisé en 32 parcelles dont les dimensions ont été standardisées. Les rangées d'arbres les plus à l'extérieur de chaque parcelle étant considérés comme des bordures ne faisant pas partie de la parcelle. Durant la thèse, l'étude des communautés de microorganismes a porté sur quatre parcelles du dispositif composées de peupliers Skado non inoculés.

### 3.2.2 Poivrons

Le poivron ou *Capsicum annuum* appartient à la famille des Solanacées (Figure 50). Les travaux de Mohamad Assad ont mis en avant la capacité de bioindication du cultivar « Yolo wonder », même pour de faibles concentrations de Hg dans l'atmosphère (Assad, 2017), et actuellement cette propriété fait l'objet d'études plus approfondies. De ce fait, durant ma thèse, ce cultivar a été cultivé en conditions contrôlées dans des phytotrons pour tester les capacités PGP de différents consortiums bactériens inoculés et estimer la capacité d'accumulation du poivron en fonction de l'inoculation dans divers organes.



Figure 50 : Le poivron *Capsicum annuum* du cultivar Yolo wonder : partie aérienne (à gauche), feuilles et fleurs (au centre) et partie racinaire (à droite).

### 3.2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* est un champignon unicellulaire de type levure qui se reproduit par bourgeonnement. C'est un organisme modèle, son génome a été le premier génome eucaryote séquencé dans sa totalité en 1996. Il contient 6 000 gènes, 16 chromosomes et une séquence de 12 méga bases (Mb) (Gofieau *et al.*, 1996). Après le séquençage, les auteurs ont pu observer que contrairement aux bactéries ou aux animaux, *S. cerevisiae* avait un très grand nombre de gènes orphelins, c'est-à-dire sans ressemblance avec des gènes connus. Le scénario envisagé implique que les levures se sont différenciées des autres êtres vivants suite à l'action de gènes à évolution rapide. Le laboratoire en collaboration avec l'Université de Lorraine dispose de plusieurs génotypes de la souche de *S. cerevisiae* BY4741 mutée sur différents transporteurs membranaires (Tableau 15).

**Tableau 15 : Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 utilisées lors de la thèse.**

Strain (phenotype)	Fonction of deleted genes	Cation supplementation of YPD media for optimal growth
BY4741 ( <i>ScWT</i> )	/	/
BY4741 ( <i>ScAlr1/2Δ</i> )	Alr1 & Alr2: Mg transporters	100 mM MgCl <sub>2</sub>
BY4741 ( <i>ScTrk1/2Δ</i> )	Trk1 & Trk2 : high affinity K uptake system	/
BY4741 ( <i>ScMid1/CCh1Δ</i> )	Mid1 & CCh1: high affinity Ca channel	100 mM CaCl <sub>2</sub>
BY4741 ( <i>ScPho84/89Δ</i> )	Pho84: high affinity P transporter Pho89: Na <sup>+</sup> /Pi cotransporter	/
BY4741 ( <i>ScSmf1/2Δ</i> )	Smf1 & Smf2: broad specificity divalent and trivalent Mn transporter	200 μM MnCl <sub>2</sub>
BY4741 ( <i>ScCtr1/3Δ</i> )	Ctr1: high affinity Cu uptake Ctr3: high affinity Cu uptake	500 μM CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O
BY4741 ( <i>ScZrt1/2Δ</i> )	Zrt1: high affinity zinc uptake Zrt2: low affinity zinc uptake	500 μM ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O
BY4741 ( <i>ScFrt1/Fet3Δ</i> )	Ftr1: high affinity Fe uptake system Fet3: Ftr1/associated Fe oxidoreductase	500 μM FeCl <sub>3</sub>
BY4741 ( <i>ScFrt1/Fet4Δ</i> )	Ftr1: high affinity Fe uptake system Fet4: low affinity Fe uptake system	500 μM FeCl <sub>3</sub>
BY4741 ( <i>ScFet3/4Δ</i> )	Fet3: Ftr1/associated Fe oxidoreductase Fet4: low affinity Fe uptake system	500 μM FeCl <sub>3</sub>
BY4741 ( <i>ScFtr1Δ</i> )	Ftr1: high affinity Fe uptake system	500 μM FeCl <sub>3</sub>
BY4741 ( <i>ScFet3Δ</i> )	Ftr1/associated Fe oxidoreductase	500 μM FeCl <sub>3</sub>
BY4741 ( <i>ScFet4Δ</i> )	Fet4: low affinity Fe uptake system	500 μM FeCl <sub>3</sub>

Durant la thèse, ce sont au total 14 souches qui ont été utilisées : la souche sauvage, 10 souches mutées sur deux transporteurs membranaires et 3 souches mutées sur un seul transporteur membranaire. Les organismes simples mutants ont été obtenus *via* Euroscarf tandis que les doubles mutants ont été préparés à l'Université de Lorraine (LIEC), à l'exception de la souche mutante pour les gènes *GeneX* et *GeneY*, obtenue par l'intermédiaire d'un partenariat (Da Costa *et al.*, 2007). Les souches sont entretenues sur des boîtes de Pétri contenant un milieu YPD (20 g.l<sup>-1</sup> glucose, 20 g.l<sup>-1</sup> bactopeptones, 10 g.l<sup>-1</sup> yeast extract) gélosé, avec ou sans supplémentation en Ion, Ca, Mn, Cu, Zn ou Fe (Tableau 15). Les souches sont stockées à -80

°C dans un milieu YPD contenant 50 % de glycérol pour éviter l'endommagement des cellules lors de la congélation et décongélation.

### 3.2.4 *Podospora anserina*

*Podospora anserina* est un champignon filamenteux qui se reproduit par sporulation. Il est utilisé comme modèle pour de nombreuses études génétiques et moléculaires de plusieurs processus biologiques. Ce champignon est coprophile, c'est-à-dire qu'il se développe sur les excréments d'herbivores. La plupart du temps, il est verdâtre mais il peut aussi être brunâtre ou les pigments peuvent également être absents. Ce champignon produit et exporte, en dehors des cellules, de nombreuses enzymes qui leur permettent de dégrader les polymères végétaux (comme la cellulose ou la lignine). Les nutriments libérés sont ensuite transportés dans la cellule fongique par des systèmes de transport très efficaces. *P. anserina* est donc un champignon saprophyte, qui s'est spécialisé pour récupérer ses nutriments à partir de matériaux qui n'ont pas été complètement digérés par les vertébrés herbivores. Il est capable d'aider à recycler le carbone qui est incorporé dans la matière végétale hautement résistante.

Le laboratoire dispose de la souche *P. anserina* sauvage, mais aussi mutante pour les gènes *GeneX/2* et son recombinant, provenant de travaux précédents (Grognet *et al.*, 2012) et dont le génome a entièrement été séquencé et est disponible sur le site suivant : <http://podospora.igmors.u-psud.fr>. Les 36 Mb de son génotype s'étendent sur 7 chromosomes. Le champignon a régulièrement été transféré sur milieu malt gélosé (12 g.l<sup>-1</sup> extrait de malt, 15 g.l<sup>-1</sup> agar, pH 4.5) ou de milieu M2 décrit par Espagne *et al.* (2008).

## 3.3 Méthodes

### 3.3.1 Communautés microbiennes : génomique environnementale

#### 3.3.1.1 Prélèvement des échantillons

Les prélèvements de sols, de racines, de tiges et de feuilles des peupliers Skado provenant de la lagune de stockage de sédiments ont été réalisés en août 2014. Nous avons choisi arbitrairement 6 points de prélèvements. Pour chacun de ces 6 points, 4 prélèvements de sols, de racines, de tiges et de feuilles ont été réalisés. Les sols et les racines ont été collectés ensemble puis les racines et le sol ont été séparés et triés de retour au laboratoire. Le sol a été séparé des racines par tamisage à 4 mm. Les racines ont été rincées dans deux bains d'eau distillée pour éliminer toute trace de sol puis les racines fines ont été découpées au scalpel et conservées. Des tiges d'axe 2 (qui porte les feuilles, les fleurs et les fruits) ont été prélevées à une hauteur de 5 m ce qui correspond à environ la moitié du houppier. Sur ces tiges, 3 feuilles

sont prélevées et considérées comme des réplicats. Les tiges sont ensuite découpées en morceaux d'environ 10 cm. Le sol tamisé, les racines fines, les tiges et les feuilles sont stockés à -20 °C. On totalise ainsi 24 échantillons par habitats, qui correspondent aux 4 prélèvements de sols, racines, tiges et feuilles effectués aux 6 points d'échantillonnage.

Pour déshydrater les échantillons afin de normaliser les pesées, ils ont été lyophilisés pendant 48 h puis homogénéisés à l'aide d'un vibrobroyeur. Par ailleurs, la lyophilisation des échantillons a été bénéfique pour la réutilisation à court, moyen et long terme des échantillons.

### **3.3.1.2 Extraction de l'ADN environnemental**

Il existe de nombreux kits commerciaux permettant d'extraire l'ADN environnemental (ADNe) d'échantillons de sols et de tissus végétaux. Mais après avoir testé de nombreux kits, il s'est avéré que les rendements d'extraction étaient trop faibles voire nuls en ce qui concerne les feuilles. En effet, il semblerait que chaque plante ait des spécificités (contenu en polyphénols et en polysaccharides, constitution des parois cellulaire) qui limitent la généricité des kits existants. C'est pourquoi, nous avons eu recours à un protocole basé sur une extraction dite organique hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)-Chloroforme-Isoamylalcool, inspiré de la littérature (Lefort & Douglas, 1999; Healey *et al.*, 2014) pour les racines, les tiges et les feuilles. Il nous est apparu que l'étape de lyse cellulaire était essentielle pour de bons rendements ; nous avons donc éprouvé notre protocole en améliorant entre autre cette étape.

Exactement environ (*ps* : signifie que la masse à peser doit être autour de « x », mais que sa valeur exacte doit être connue) 15 mg de feuille, 40 mg de tige et 20 mg de racine ont été ajoutés à 10 µl de mercaptoéthanol, 50 µg de protéinase K et 1 ml de tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 0,7 M, CTAB 1% (m:v), PVP 40 1% (m:v) et SDS 2% (m:v)). La solution a été agitée puis placée 40 min à 60 °C puis trois chocs thermiques successifs de 15 min à 60 °C, suivis de 10 min à -20 °C ont été appliqués. Ensuite, 0,5 ml de chloroforme/isoamylalcool (24/1, v:v) ont été ajoutés, puis l'extrait agité par retournement, centrifugé à 17 000 g, enfin le surnageant a été prélevé. Un volume équivalent d'isopropanol a été ajouté puis le tout centrifugé 2 min à 17 000 g. Le surnageant a été éliminé puis le culot d'ADN a été rincé à l'éthanol. Enfin le culot a été repris dans 50 µl d'eau distillée ultra-pure et stocké à -20 °C. Pour les échantillons de sol, l'ADNe a été extrait à l'aide du kit PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA USA) en suivant le protocole du constructeur puis l'extrait d'ADNe est également stocké à -20 °C.

Pour éliminer le maximum d'inhibiteurs pouvant interférer avec le séquençage haut-débit, les ADNe ont été purifiés après extraction organique avec le kit PowerClean DNA Clean-

Up (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA USA) en suivant le protocole du constructeur. En effet, les acides humiques, les polyphénols, les polysaccharides ou encore les métaux présents dans l'environnement et co-extraits avec l'ADNe peuvent entraver la détection de la séquence cible (Colinon *et al.*, 2013). Cette étape est essentielle pour la suite de la procédure, mais une quantité non négligeable d'ADNe est perdue. Nous n'avons pas testé d'autres kits de purification, mais une optimisation par les constructeurs de cette étape pourrait faciliter notre démarche. Les ADNe purifiés ont été ensuite stockés à -20 °C.

Les résultats de cette étape sont visualisés par la séparation des fragments d'ADN sur gel d'électrophorèse. Les ADNs étudiés sont mélangés à un tampon de charge (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, bleu de bromophénol 0,25 % (v:v), bleu de xylène cyanol 0.25% (v:v), glycérol 30% (v:v), pH 8). Puis les ADNe et un marqueur de taille (déposé à gauche typiquement) sont déposés sur un gel d'agarose à 1 % (m:v) et migrent pendant environ 45 min à 90 V. Le gel est un mélange d'agarose et un tampon TBE (107,8 g.l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 6.5 ; 55 g.l<sup>-1</sup> borate, 5.8 g.l<sup>-1</sup> EDTA). La visualisation de l'ADN s'effectue via une révélation au BET (bromure d'éthidium 0,2 µg.l<sup>-1</sup>) sous illumination UV assurée par le Gel Doc™ EZ imager (Bio-Rad, USA). L'appareil permet l'acquisition de l'image et le logiciel Image Lab permet son traitement (Figure 51).

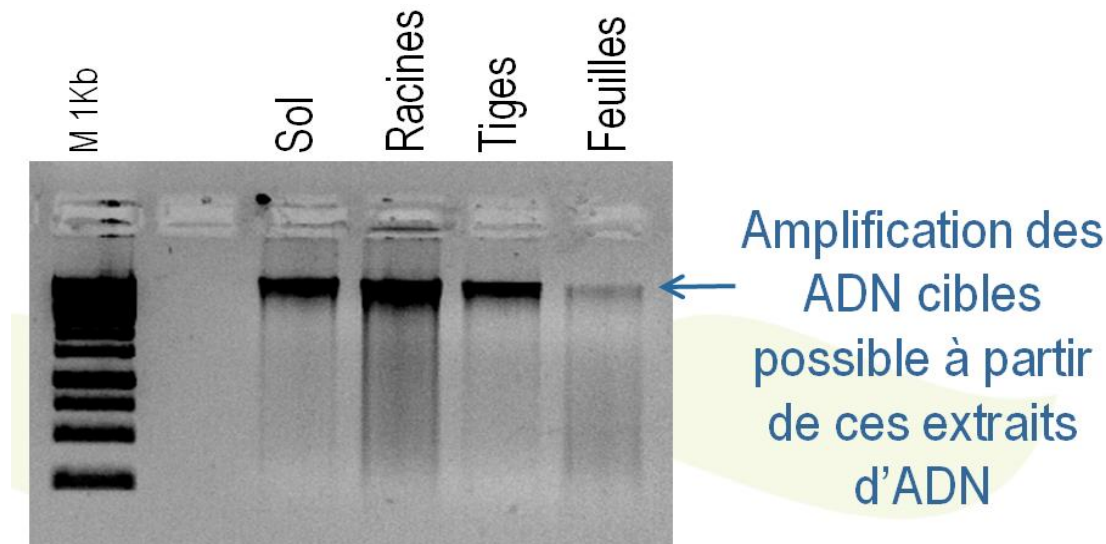
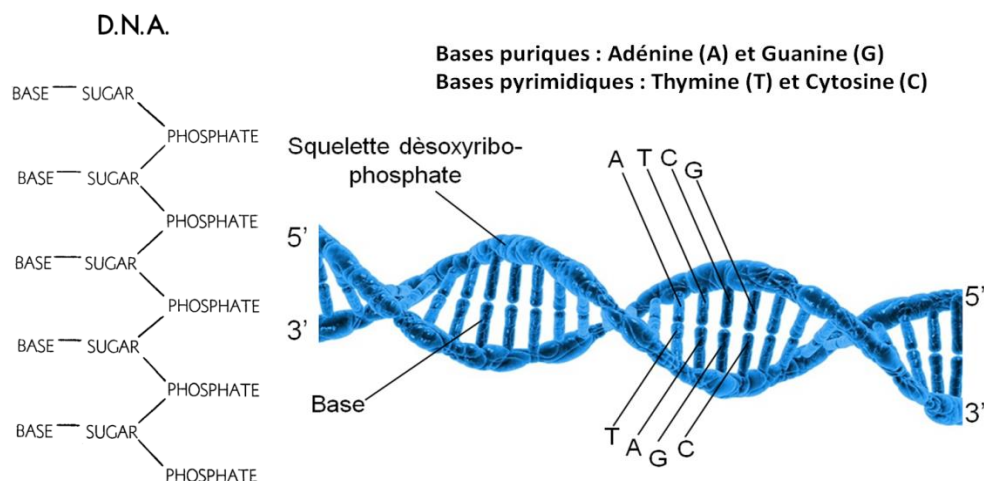


Figure 51 : Gel d'agarose sur lequel ont migré des extraits d'ADN total de chaque habitat visualisé. Les bandes noires sont des amas d'ADN révélés grâce au BET et au UV.

### 3.3.1.3 L'amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR)

La Figure 52 présente la structure de l'ADN :



**Figure 52 : La structure de l'ADN par ses découvreurs (Watson & Crick, 1953) (à gauche) ; vue d'artiste d'un double brin d'ADN en hélice alpha (à droite).**

Pour la suite de la démarche, il nous faut introduire le principe de PCR très couramment utilisé en biologie moléculaire. Brièvement, l'objectif de la PCR est de répliquer une partie très spécifiquement choisie de la séquence d'ADN, de très nombreuses fois, pour pouvoir détecter la présence ou l'absence de la région d'ADN cible et de pouvoir la quantifier (de façon relative). De nombreux paramètres peuvent être influencés pour améliorer le résultat d'une PCR : la polymérase utilisée, le choix des amorces, les températures d'hybridation et de dénaturation, la durée de chaque étape du cycle, le nombre de cycles, la proportion de nucléotides, l'ajout de divers produits pour limiter l'impact des inhibiteurs de PCR ; pour ne citer que les paramètres les plus importants. Toutes ces variables étant de surcroît interdépendant, ajuster les conditions de PCR est parfois une tâche complexe. L'exemple le plus classique de la PCR en microbiologie vise à amplifier le marqueur génétique de bactéries cultivables isolées sur milieux gélosés qui permet par la suite de leur assigner une taxonomie, on parle d'identification moléculaire de la souche bactérienne. Il s'agit d'amplifier la région de l'ADN ribosomique 16S en utilisant le couple d'amorces 27f – 1492r : AGAGTTTGATCMTGGCTCAG – CCGTTACCTTGTACGACTT. Le mélange des ingrédients pour la PCR est appelé couramment « Master Mix ».

#### **3.3.1.4 Choix des amorces et séquençage Sanger**

L'ADN issu de l'extraction d'échantillons de racines, de tiges et de feuilles provient des microorganismes associés à ces habitats, mais aussi de l'ADN du peuplier. Notre objectif étant de décrire les communautés bactériennes et fongiques, les régions de l'ADN utilisées en séquençage d'amplicons haut débit sont respectivement localisées dans la petite sous-unité de l'ARN Ribosomique 16S et ITS (Internal Transcribed Spacer). Or, les plantes possèdent ces deux régions du génome, cela rend impossible l'utilisation des couples d'amorces

classiquement utilisés sur des matrices non végétales comme le sol, avec le risque d'obtenir un pourcentage extrêmement important de séquences végétales. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser deux couples d'amorces développés qui permettent l'exclusion des séquences chloroplastiques et mitochondriales ainsi que l'ITS de plantes. Ces amorces ont déjà été testées par le passé et ont prouvé leur relative efficacité : il s'agit pour les champignons du couple ITS1f - ITS2 : CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA – GCTGCGTTCTTCATCGATGC (Danielsen *et al.* 2012; Coince *et al.* 2014) et pour les bactéries du couple 799f - 1115r : AACMGATTAGATACCCKG – AGGGTTGCGCTCGTTG (Lucisine *et al.*, 2014; Kembel *et al.*, 2014; Laforest-Lapointe *et al.*, 2016). Ces deux couples d'amorces ont été mis à l'épreuve sur nos échantillons d'ADNe de feuilles par amplification puis clonage des produits PCR des marqueurs génétiques et séquençage Sanger des bactéries transformées pour déterminer si les amplicons obtenus appartenaient bien au microbiome et n'étaient pas de l'ADN de la plante (Figure 53).

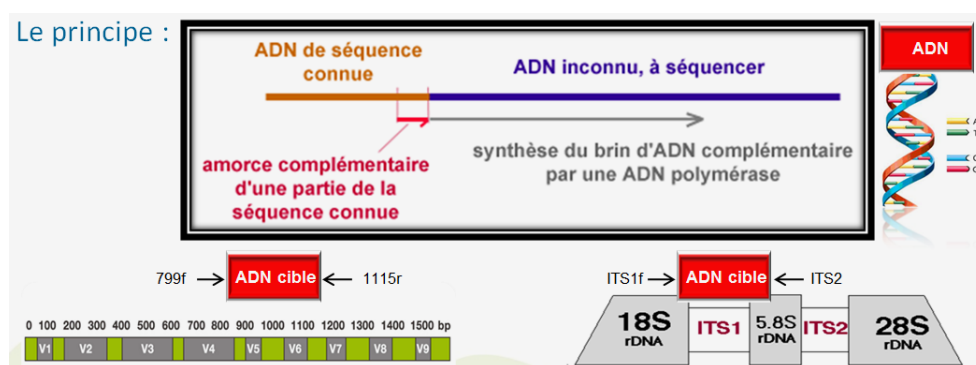
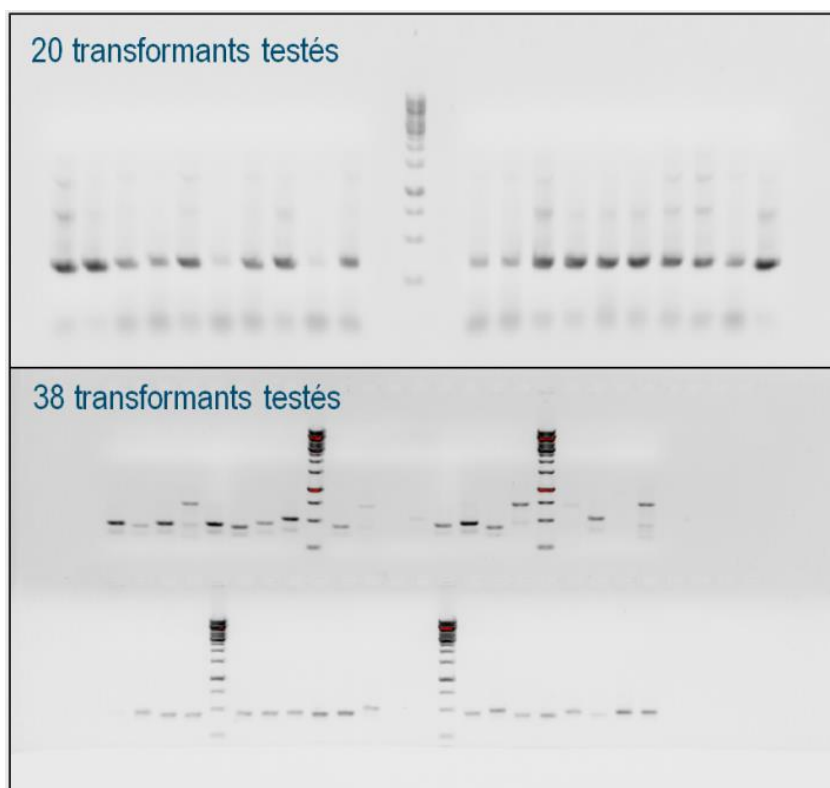


Figure 53 : Principe pour l'amplification des marqueurs génétiques bactériens et fongiques.

Les amplicons correspondant aux marqueurs génétiques voulus sont amplifiés par PCR, le produit de cette PCR est mis à migrer sur un gel d'électrophorèse. La bande d'ADN cible est excisée du gel puis récupérée dans un tampon et purifiée. Une queue de nucléotides dite polyA est ajoutée aux séquences d'ADN cible pour pouvoir permettre ensuite la ligation des fragments d'ADNs dans un plasmide. Le plasmide est une structure d'ADN qui peut relativement facilement être intégré à une cellule bactérienne compétente *Escherichia coli*. Les plasmides chargés de leur ADN cible vont être mis en contact avec la bactérie pour réaliser la transformation. Les transformants, c'est à dire les bactéries qui ont réussi l'intégration du plasmide, sont ensuite sélectionnés par la résistance antibiotique (l'ampicilline dans notre cas) et par leur couleur bleue, deux propriétés que confère le plasmide aux transformants. Une nouvelle PCR ciblant l'ADN inséré dans les bactéries, via le couple d'amorce SP6-T7 dépendant du plasmide, permet de dénombrer le nombre de transformants effectifs (Figure 54). Pour le marqueur génétique 16S bactérien, on obtient 18/20 transformants et pour le marqueur

génétique 18S fongique, l'ensemble des *E. coli* testé a été transformé. Notons que la taille des amplicons 18S (Figure 54) est variable potentiellement du fait de l'insertion d'ADN dans cette région du génome. Cependant cette variabilité n'a pas fait l'objet de plus d'investigation.



**Figure 54 : Migration sur gel d'électrophorèse des PCR sur les transformants portant l'ADN 16S (en haut) et 18S (en bas) sur leur plasmide. Les bandes noires sont des amas d'ADN révélés grâce au BET et aux UV impliquant la bonne intégration des marqueurs génétiques dans *E. coli*.**

La deuxième étape consiste à faire séquencer ces fragments d'ADN cible par séquençage Sanger, ce que nous avons délégué à la société Beckman Coulter Genomics. En bref, la méthode de séquençage Sanger consiste à ajouter les nucléotides un à un par synthèse enzymatique, puis à révéler le nucléotide ajouté à chaque étape pour déterminer la séquence d'ADN complète. A la fin du processus chacune des quatre polymérisations va engendrer des séquences qui se sont terminées à différentes positions (Figure 55). La position terminale est associée au nucléotide correspondant au di-désoxyribonucléotides ajouté à la réaction de polymérisation. Au final pour chaque position de la séquence il est possible d'attribuer un nucléotide et donc de reconstituer la séquence nucléotidique en entier. Remarquons que pour déterminer à quelle position de la séquence s'est arrêtée la polymérisation, les fragments d'ADN vont migrer sur un gel d'électrophorèse qui permet de déterminer leur taille.



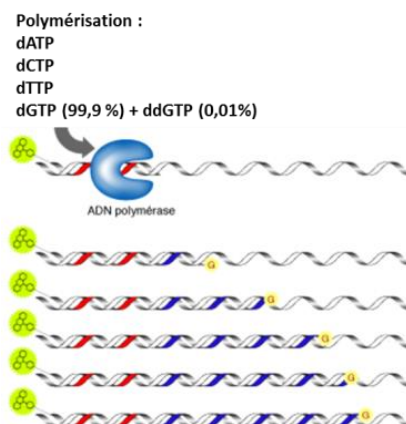


Figure 55 : Principe de la polymérisation spécifique du séquençage Sanger <sup>17</sup>.

Dans notre cas, la spécificité des couples a été confirmée puisque sur 20 séquences ITS aucune n'était issue de tissus végétal et sur 20 séquences théoriquement isolées de bactéries 1, seule correspondait à une séquence mitochondriale, ce qui correspond au pourcentage donné dans la littérature. Nous avons donc conservé ces amorces pour la suite du processus. L'assignement des séquences est réalisé par comparaison avec la base de données du « National Center for Biotechnology Information » (NCBI).

### 3.3.1.5 Séquençage très haut débit Illumina MiSeq

Les concentrations en ADNe ont été ajustées à  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  après dosage au Qubit® 3.0 Fluorometer (Invitrogen™, life technologies, Malaisie), qui permet le dosage quantitatif et qualitatif de l'ADN, puis les échantillons des quatre habitats ont été envoyés à la société Microsynth (Suisse), qui a pris en charge les échantillons jusqu'au séquençage final. Deux étapes de PCR sont réalisées : la première consiste à amplifier les ADNe avec le couple d'amorces sélectionné (799f - 1115r pour les bactéries et ITS1f - ITS2 pour les champignons), complétées d'adaptateurs du côté sens et anti-sens. Ces adaptateurs, qui bordent les séquences, permettent, lors de la deuxième étape de PCR, d'ajouter un adaptateur de séquençage et une séquence « index » donnant la possibilité de référencer l'échantillon. Cet index permet de combiner plusieurs échantillons lors d'une même expérience de séquençage (Meyer & Kircher, 2010). Les séquences sont ensuite liées à une surface comportant de nombreuses séquences adaptatrices libres. Une PCR est réalisée et les fragments se lient aux séquences adaptatrices libres formant des « ponts ». On obtient ainsi des groupes d'amplicons appelés « clusters » correspondant à la séquence initiale. Les ponts sont ensuite ouverts pour donner une séquence ayant une extrémité libre et la réaction de séquençage proprement dite peut commencer à partir

<sup>17</sup> <http://www.jpboeret.eu/biologie/index.php/genetique/65-methode-de-sanger-et-pcr>

de l'extrémité non liée. Une base marquée par fluorescence (une couleur par base) est ajoutée puis il y a acquisition de l'image et clivage chimique du groupement. Ce cycle se répète jusqu'à séquençage complet de l'amplicon. La technologie Illumina MiSeq a été choisie car elle permet le séquençage de 250 bases du côté sens et anti sens. La qualité des séquences obtenues est ainsi améliorée par rapport aux technologies ne présentant qu'un sens de séquençage. De plus, le coût par base de la technologie « Illumina » était le plus bas à ce moment de la thèse.

### 3.3.1.6 Traitement bio-informatique des séquences : « Pipeline »

Après quelques semaines de séquençage en Suisse, les séquences nous sont retournées, via un serveur, sous forme d'un fichier texte par échantillon et sous un format particulier, l'extension .fastq. Chaque échantillon produit des dizaines de milliers d'amplicons et la somme totale des séquences obtenues dépassent le million de séquences. Ainsi, un traitement rigoureux et systématique des séquences ne peut être obtenu que par l'intermédiaire d'un traitement informatique. Pour le traitement des séquences fongiques, le pipeline a été conçu par le docteur Gweon et ses collaborateurs (2015). Ce pipeline, appelé PIPITS, est sous divisé en trois grandes étapes : (i) PIPITS\_PREP correspond à la jonction des brins d'ADN et les filtres de qualité, (ii) PIPITS\_FUNITS correspond à la détection de la région cible, et (iii) PIPITS\_PROCESS correspond au filtre des artéfacts, chimères et contaminations, ainsi qu'à l'assignement taxonomique des OTUs (Figure 56).

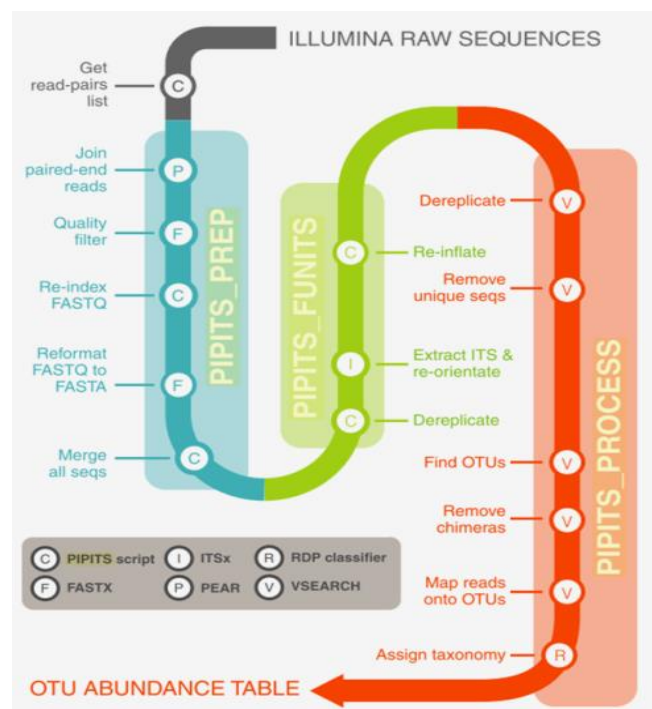


Figure 56 : PIPITS, le pipeline automatisé pour l'analyse de séquences fongiques ITS obtenu par séquençage « Illumina » (Gweon *et al.*, 2015).

Ci-après, une explication plus détaillée des différentes étapes du pipeline :

- Get read-pairs list : permet le formatage d'un fichier de référence pour les noms des échantillons et les noms des fichiers contenant les séquences amplifiées par l'amorce sens et anti sens (les fichiers .fastq).
- Join paired-end reads : regroupe les séquences (reads) sens et anti sens correspondantes sur leur zone de chevauchement.
- Quality filter : filtre les séquences selon la qualité du chevauchement de l'étape précédente.
- Re-index FASTQ : un numéro d'index et un identifiant sont réattribués à chaque séquence pour optimiser la suite.
- Reformat FASTQ to FASTA : est un changement de format du fichier texte consécutif de l'étape précédente.
- Dereplicate : les séquences absolument identiques vont être traitées comme une seule et même séquence « étendard » pour la prochaine étape pour diminuer le temps de calcul. L'information n'est pas perdue puisque l'indexation des séquences permet leur association à une séquence « étendard ».
- Extract ITS and re-orientate : il est possible de sélectionner la région de l'ADN fongique ciblé, soit la région ITS1 dans notre cas (ITS1 ou ITS2). La région sélectionnée est alors extraite depuis la séquence ADN puis l'ADN est réorienté en 5' – 3'. Pour ce faire le logiciel utilise ITSx lui-même dépendant de HMMER3.
- Re-inflate : par opposition à la commande « Dereplicate », cette dernière réindividualise les séquences pour ne pas perdre l'information sur l'abondance.
- Dereplicate : *idem*
- Remove unique seqs : les séquences qui n'ont absolument aucune autre séquence identique sont considérées comme des artefacts, trop rares pour avoir de l'importance et sont supprimées. Par ailleurs, les séquences de moins de 100 paires de bases (pb) ne sont pas gardées.
- Find OTUs : les séquences sont rassemblées en groupes nommés Opérationnel Taxonomic Units (OTUs) en utilisant le programme VSEARCH. Une OTU représente un groupe d'amplicons proches, c'est-à-dire, dont la séquence nucléotidique est identique à « x » pourcent. Dans notre cas, le seuil de ressemblance a été fixé à 97 %, ce qui correspond classiquement à l'approximation qui sert de définition pour l'espèce lorsque l'on considère la région d'ADN ITS1. Autrement dit, une OTU regroupe des séquences appartenant à la même espèce d'un point de vue génétique. Ce seuil peut être modifié à loisir ce qui changera la définition de l'OTU.
- Remove chimeras : les séquences sont comparées à une base de données de séquences chimériques connues (UNITE UCHIME) et celles détectées sont supprimées.
- Map reads onto OTUs : après que les derniers filtres sont appliqués, les séquences (ou « reads) sont regroupées en OTUs et mis en forme pour assignement.
- Assign taxonomy : les OTUs sont comparées à la base de données UNITE, à l'aide du logiciel RDP Classifier, pour attribuer une taxonomie à chaque OTU. Chaque OTU se voit donc attribuer les 7 niveaux de la taxonomie des microorganismes : Règne > Phylum > Classe > Ordre > Famille > Genre > Espèce

Pour le traitement des séquences bactériennes, le pipeline a été conçu par le Docteur Benoit VALOT sous le logiciel Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Ce protocole suit globalement la même structure que le protocole précédemment décrit en détail. Plus brièvement :

- Des « contigs » sont réalisés à partir des séquences sens et anti-sens puis les « reads » sont filtrés selon leur taille et leur qualité.
- Un regroupement préalable autour d'une identité des séquences 16S à 99 % est réalisé en utilisant « sumacust » (Mercier *et al.*, 2013). Cette étape correspond à l'étape « Dereplicate » explicitée précédemment. Dans ce protocole, les groupes ne sont pas constitués de séquences parfaitement identiques mais de séquences très similaires (99 % de leurs nucléotides en commun) ce qui permet de réduire le nombre de séquences à traiter avec une perte négligeable d'information. Cette étape est fréquente pour le marqueur génétique 16S qui permet de faire de plus gros groupes, mais moins nombreux.
- Seuls les regroupements de plus de 8 « reads » sont conservés pour la suite du traitement informatique. Ceci correspond à l'étape « Remove unique seqs » du pipeline précédent qui, lui, conservait tous les groupes de 2 séquences et plus. Notre pipeline est donc plus stringent sur cette étape, qui, rappelons-le, supprime les séquences considérées comme des artefacts.
- Les séquences sont alignées sur la base de données Silva pour éliminer les « reads » qui ne sont pas des marqueurs génétiques 16S. De plus, les « reads » associés à « k\_\_Bacteria(100);p\_\_Cyanobacteria(100);c\_\_Chloroplast(100);o\_\_Streptophyta(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100) » sont éliminés.
- L'assignement taxonomique est réalisé en utilisant l'approche Bayésienne naïve (Wang *et al.*, 2007) dans la base de données Greengene (DeSantis *et al.*, 2006). Cet assignement a l'avantage de ne pas nécessiter l'alignement des séquences, de pouvoir fonctionner malgré des séquences partielles dans la base de données et d'être rapide. D'ailleurs, selon l'auteur : “**Naïve Bayesian assignment.** By Bayes' theorem, the probability that an unknown query sequence,  $S$ , is a member of genus  $G$  is  $P(G/S) = P(S/G) \times P(G)/P(S)$ , where  $P(G)$  is the prior probability of a sequence being a member of  $G$  and  $P(S)$  the overall probability of observing sequence  $S$  (from any genus). Assuming all genera are equally probable (equal priors), the constant terms  $P(G)$  and  $P(S)$  can be ignored. We classify the sequence as a member of the genus giving the highest probability score, but we ignore the actual numerical probability estimate.” (Wang *et al.*, 2007)
- Les OTUs sont construites en utilisant l'algorithme de Needleman-Wunsch, couramment utilisé dans ce cas, avec un seuil de ressemblance génétique fixé à 97 %.

Pour la réalisation de ce traitement bio-informatique, il a fallu manipuler les données sous la licence d'utilisation Ubuntu, étant donné que le pipeline Mothur ne fonctionne pas sous Windows. Par ailleurs, la machine utilisée se devait d'avoir une puissance de calcul importante. Caractéristiques de l'ordinateur : Ubuntu, Intel®Core™i7-4790 CPU @ 3.60GHz x8, 16GB RAM.

### 3.3.1.7 Analyses post-traitement informatique

L'analyse post-séquençage implique des manipulations statistiques qui nous contraignent à l'utilisation de données normalisées, dans l'optique de donner les mêmes « poids » à chaque réplica. Pour ce faire, les données sont sous-échantillonnées au même nombre de séquences par échantillon. Pour les champignons nous avons sélectionné le nombre de séquences de l'échantillon qui contient le moins de reads fongiques, soit 26 671, et pour les bactéries nous nous sommes ajusté à 3000 reads par échantillon.

L'analyse en deux dimensions « Non-metric Multi-Dimensional Scaling » (NMDS) avec 1000 itérations a été réalisée en utilisant la méthode de Bray Curtis ( $k=3$ ), en utilisant la fonction « metaMDS » du package Vegan dans R. De plus, associée à la NMDS, nous avons réalisé une « Analysis Of SIMilarities » (ANOSIM) avec 1000 itérations à l'aide de la fonction « anosim » du package Vegan dans R. Les diagrammes de Venn ont été réalisés à l'aide de la fonction « VennDiagram » du package Vegan dans R et à l'aide de la fonction « venn » dans Mothur. Une OTU est représentative d'un habitat uniquement si elle est présente dans plus de 25% des échantillons de l'habitat.

La courbe de raréfaction a été créée avec la fonction « raréfaction » du package Vegan dans R (Work *et al.*, 2010). A l'aide de Mothur (Schloss *et al.*, 2009) et de la fonction « calculators », le « Good's coverage », les indices de diversité alpha ont été calculés (la richesse en OTU, « Chao estimation », « Shannon diversity index », l'inverse de « Simpson diversity index », mesure de « evenness » basée sur l'indice de Shannon). Le « Good's coverage » est calculé tel que suit :  $C = [1-(n/N)]*100$  (%), où  $n$  est le nombre d'OTUs, et  $N$  est le nombre de séquences.

L'« PERMutational ANalysis Of the Variance » (PERMANOVA), a été réalisé à l'aide de la fonction « adonis » du package Vegan dans R. La production de « heatmap » est réalisée avec « heatmap.2 » du package « gplots » dans R. En plus des « heatmap », l'utilisation de la fonction « multipatt » du package « indicespecies » permet d'évaluer les OTUs en tant que bioindicateurs de leur compartiment (De Cáceres *et al.*, 2012). Les figures dites « riverplot » sont réalisées à partir d'un script personnalisé à partir de la fonction « riverplot » dans R. La construction de modèles pour l'interprétation des réseaux a été réalisée à partir d'OTUs issues de plus grand regroupement de « reads », un seuil de ressemblance génétique a été fixé à 90 %. Ceci permet de faciliter la visualisation et l'interprétation des résultats (Bell *et al.*, 2014). De plus les OTUs les plus rares ont été filtrées, c'est-à-dire celles apparaissant dans moins de 25 % des échantillons et présentant une abondance relative, inférieure à 0,01% (Weiss *et al.*, 2016). Le réseau a alors été construit avec l'application CoNet (v. 1.1.b) (Faust & Raes, 2012) du logiciel Cytoscape (v. 3.3.0) (Christmas *et al.*, 2005) en suivant le protocole de Faust et de ses collaborateurs (Faust *et al.*, 2015).

### **3.3.2 Communautés microbiennes : approche culture-dépendante**

#### **3.3.2.1 Prélèvement des échantillons**

Des échantillons de sol, de racines, de tiges et de feuilles ont été prélevés sur les peupliers du cultivar Skado, implantés sur l'ancienne lagune de stockage de sédiments, sur les

mêmes parcelles que celles utilisées lors de la génomique environnementale. Les prélèvements ont été réalisés durant les étés 2015 et 2016 (Figure 57).



Figure 57 : Le dispositif expérimental à Tavaux fin mai 2015 lors de la première campagne d'isolement.

Pour l'isolement de bactéries, le sol éloigné des racines (3,5 g) a été dilué dans 35 ml de tampon phosphate salin (PBS). Les racines ont été agitées manuellement pour décrocher la majeure partie du sol, puis elles sont mises à agitation pendant 30 min à 150 rpm dans 35 ml de PBS afin de mettre en solution le sol au contact direct des racines, appelé sol rhizosphérique. Les racines sont ensuite retirées de la solution de tampon phosphate salin. Les solutions de PBS et de sol rhizosphérique sont centrifugées à 14 000 g pendant 10 min et 1 g du culot de sol rhizosphérique est pesé et dilué dans 35 mL de PBS. Les tiges et les feuilles sont mises à agiter pendant 1 h à 150 rpm dans 150 mL de PBS afin de décrocher les bactéries se développant sur les tissus, appelées bactéries épiphytes. Afin d'isoler uniquement les bactéries se développant dans les tissus, appelées bactéries endophytes, les racines, les tiges et les feuilles, précédemment utilisées, sont désinfectées en surface pendant 2 min dans une solution d'hypochlorite de sodium concentrée à 2%, puis rincées à 5 reprises, avec de l'eau distillée stérile. Les racines, les tiges et les feuilles, précédemment désinfectées, sont ensuite broyées dans 35 ml de PBS et mises à macérer à 100 rpm pendant 1 h. Des feuilles intactes ont été prélevées, comme pour les bactéries, en vue de l'isolement de levures.

### **3.3.2.2 Isolement de microorganismes résistants au Hg**

Dans le cadre du projet FREIDI-Hg, nous avons isolé des microorganismes pouvant jouer un rôle dans le cycle du Hg afin de conduire par la suite des essais d'inoculation. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser des milieux d'isolements concentrés en Hg afin d'établir une présélection des souches potentiellement résistantes.

Pour maximiser le nombre de bactéries potentiellement cultivables, deux milieux de cultures sont choisis, un milieu riche et un milieu environnemental, respectivement appelés 869 et 284 (Eevers *et al.*, 2015b). Afin de sélectionner les souches bactériennes résistantes au Hg, les milieux sont préparés avec 10  $\mu\text{M}$  de Hg (Francois *et al.*, 2012). Les solutions de PBS, précédemment préparées, sont diluées au 1/10 en cascade de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  pour le sol et le sol rhizosphérique, de  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$  pour les bactéries épiphytes de tiges et de feuilles et de  $10^0$  à  $10^{-3}$  pour les bactéries endophytes de racines, de tiges et de feuilles. Enfin, 100  $\mu\text{l}$  de chaque dilution sont étalés sur les deux milieux de cultures choisis avec 3 répétitions par dilution et par milieu. Les boîtes sont mises à incuber à l'étuve pendant 6 j à 27 °C. Après le temps d'incubation, les souches bactériennes sont isolées sur un milieu 869 puis conservées à -80 °C dans une solution de glycérol (80%, v :v) et de milieu cœur-cerveau (20%, v :v). Une stratégie d'isolement sans présélection des souches par le Hg et avec 2  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  et de dénombrement du nombre d'unités formant colonie (UFC) ont été mises en place en parallèle, pour pouvoir comparer la cultivabilité des microorganismes dans chaque habitat. De plus, dans la phyllosphère, en 2016, les bactéries sélectionnées l'ont été sur des milieux enrichis à la concentration de 2  $\mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$ .

Les levures ont été isolées à l'aide d'une technique d'enrichissement précédemment décrite (Fu *et al.*, 2016). Immédiatement de retour au laboratoire, les feuilles encore intactes ont été incubées avec leur pétiole, dans un milieu d'enrichissement contenant : 30  $\text{g.l}^{-1}$  malt, 5  $\text{g.l}^{-1}$  peptone et de l'extrait filtré de feuilles broyées dans de l'eau distillée stérile 5  $\text{ml.l}^{-1}$ . Le pH est ajusté à 3,7 avec de l'acide lactique et un antibiotique (pénicilline 20  $\text{mg.l}^{-1}$ ) est ajouté. Ce procédé favorise les levures vis-à-vis des autres microorganismes. En outre, dans le milieu, sont ajoutées différentes concentrations en  $\text{HgCl}_2$  : 0, 2, 5, 10 or 20  $\mu\text{M}$ . Après 48 h à 27 °C à 200 rpm, 100  $\mu\text{l}$  de suspension de levures sont étalés sur des boîtes de Pétri gélosés d'extrait de malt (12  $\text{g.l}^{-1}$  malt) ou de milieu PDA (Potato Dextrose Agar, sigma) enrichi en Hg, à une concentration identique à l'étape précédente. Le nombre d'unités formant colonie (UFC) par millilitre a été déterminé, puis les levures sont conservées dans des milieux d'isolement supplémenté avec 35% (v :v) de glycérol et maintenus à -80 °C pour les analyses futures. Ce sont les levures isolées à 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$  qui ont été utilisées par la suite.

### **3.3.2.3 Caractérisation génétique des microorganismes résistants au Hg**

Les ADN des bactéries et des levures ont été extraits afin de permettre les approches de biologie moléculaire. La technique du « boiling » a été utilisée. Elle consiste à appliquer un choc thermique puis une centrifugation à une solution de bactéries : 10 min à 95 °C puis 10 min

à -20 °C puis 10 min à 14 000 g afin de libérer l'ADN puis de culotter les débris cellulaires. L'ADN ainsi extrait est stocké à -20 °C. Pour les microorganismes récalcitrants le kit « EZNA isolation kit bacterial DNA » (OMEGA bio-tek, USA) a été utilisé.

Pour les bactéries isolées, nous avons eu recours à la BOX PCR pour supprimer de la collection les souches bactériennes identiques. La Box PCR est une technique dite de “fingerprinting” qui permet de définir si deux souches bactériennes sont identiques ou non sur la base de l'amplification de leurs séquences d'ADN répétées (Becerra-Castro *et al.*, 2011). L'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl contenant : 0,625 unités de Thermoprime Taq DNA polymérase, 75 mM Tris-HCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% (v/v) Tween 20 et chaque DNTp à 0,2 mM (ReddyMIX PCR Master Mix, Thermo Fisher), l'amorce BOX A1R 2 µM (CTACGGCAAGGCGACGCTGACG) et l'ADN bactérien (1 µl). Les conditions PCR sont les suivantes : 2 min à 95 °C (1 cycle), 25 sec à 95 °C, 35 sec à 50 °C, 65 sec à 72 °C (35 cycles) et 5 min à 72 °C (1 cycle). Les produits d'amplification sont ensuite séparés sur un gel d'agarose à 1% pendant 3 h à une tension électrique de 40 V. Les images des gels ont été traitées avec le logiciel Gel Compar (Bionumerics, Applied Maths, Belgique) qui permet de classer les souches à partir de la taille et du nombre de bandes d'ADN présentes sur le gel d'électrophorèse via la construction d'un dendrogramme avec la méthode UPGMA. Pour chaque groupe de souches présentant plus de 97% de similarité selon le dendrogramme, une seule souche a été conservée pour les analyses suivantes. Les souches dédoublonnées grâce à la BOX-PCR ont été identifiées par amplification et séquençage d'une partie du gène codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomique avec le couple d'amorces 27F - 1492R TCCGCAAGTNGCVACBGTNGG – ACCATCGTCAGRTARGGRAAVA (Vetriani *et al.*, 2005). L'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 50 µl contenant : Thermoprime Taq DNA polymerase : 0,625 unités, Tris-HCl 75 mM, (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Tween 20 0,01% (v :v), Dntps 0,2 mM (ReddyMIX PCR Master Mix, Thermo Fisher), les deux amorces à 0,4 µM de et 1 µL d'ADN bactérien. Les conditions PCR sont les suivantes : 2 min à 95 °C (1 cycle), 25 sec à 95 °C, 35 sec à 55 °C, 65 sec à 72 °C (35 cycles) et 5 min à 72 °C (1 cycle). Les produits PCR ont été purifiés avec le kit GENE CLEAN Turbo Kit en suivant les instructions fournies par le constructeur. Les produits PCR purifiés ont été séquencés par la société Genewiz Beckman Coulter Genomics (Royaume Uni) avec l'amorce 27F. Les séquences obtenues ont été confrontées à la base de données NCBI et le meilleur résultat d'identification pour chaque bactérie a été conservé. Après avoir corrigé et aligné les séquences dans Bioédit v7.2.6. (Hall, 1999), elles ont été organisées dans un arbre phylogénétique selon le modèle optimal construit à l'aide du logiciel MEGA.



Pour les levures, l'ensemble de celles isolées sur 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$  ont été identifiées par amplification PCR du domaine D1/D2 de l'ARNr à l'aide des amorces universelles sens ITS-1 (TCCGTAGGTGAACCTGCG) et anti-sens NL-4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG) (Sun *et al.*, 2014a). Les conditions PCR sont analogues à celles utilisés pour les bactéries. Les produits de PCR ont également été séquencés par Genewiz Beckman Coulter Genomics (Royaume-Uni).

#### **3.3.2.4 Caractérisation phénotypique des microorganismes**

Chaque microorganisme a été criblé pour les traits fonctionnels suivants : concentration minimale inhibitrice en Hg, détection du gène de résistance au Hg *merA*, détection du gène *nifH* de fixation d'azote atmosphérique, production d'AIA phytohormone de croissance, production de sidérophores molécules de prospection des cations métalliques (fer) et solubilisation du tricalcium phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), témoin probable de la production d'acides organiques.

La concentration minimale inhibitrice en Hg (CMI), qui représente la plus petite concentration en Hg à partir de laquelle une souche bactérienne ou la levure voit son développement totalement inhibé, a été mesurée pour les souches préalablement sélectionnées grâce à la BOX-PCR. Une gamme de milieu liquide Luria-Bertani (LB) concentrée à 0, 4, 8, 16, 32, 64, 128, et 256  $\mu\text{M}$  de Hg a été préparée pour les bactéries et la même gamme préparée en milieu YPD pour les levures. La mesure de la CMI a été réalisée en plaque 96 puits avec trois répétitions par concentration pour chaque microorganisme. La souche de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 présentant un opéron *mer* a été utilisée comme contrôle positif pour sa tolérance élevée au Hg. Les microorganismes ont été mis en culture pendant 24 h dans un milieu liquide Luria-Bertoni (bactéries) ou YPD (levures) puis 2  $\mu\text{l}$  de culture ont été ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont mises à l'étuve durant 48 h à 27 °C. Enfin, le développement bactérien est mesuré à l'aide d'un lecteur de microplaque par absorbance à une longueur d'onde de 595 nm.

L'amplification du gène *merA* a été réalisée sur 3  $\mu\text{l}$  d'ADN bactérien dans un volume final de 20  $\mu\text{l}$  contenant 10  $\mu\text{l}$  de PCR master mix 2x (ThermoFisher Scientific, France), 0.5  $\mu\text{M}$  de chaque primers (Eurofin genomics, France) : MerA2F (5'-CCT GCG TCA ACG TCG GCT G-3') et MerA2R (5'-GCG ATC AGG CAG CGG TCG AA-3') (Poulain *et al.*, 2015). La PCR s'est déroulée dans un thermocycleur (i-cycler, BioRad) dans les conditions suivantes : 10 min à 95 °C, 35 cycles de 30 sec à 95 °C, 15 sec à 63 °C, et 30 sec à 72 °C, et finalement 5 min à 72 °C.

La capacité des souches à fixer l'azote atmosphérique a été déterminée en premier lieu par une méthode adaptée du milieu semi solide sans azote (N-free semisolid malate medium

(NFb)) (Baldani & Döbereiner, 1980). Ce milieu a été inoculé par les souches bactériennes dans un tube en verre avant d'être incubé durant 10j à 25 °C sans agitation. Ensuite, les souches qui ont poussées sont transférées à nouveau dans un milieu NFb frais puis incubées de façon identique. Lors de cette seconde incubation, les tubes qui présentent la pellicule caractéristique des bactéries diazotrophes sont dénombrés. Sur les bactéries de ces pellicules a été réalisée l'amplification par PCR des gènes *nifH*. Le volume total de 25 µl contient : 5 µl d'ADN bactérien, 12,5 µl de PCR master mix 2x, 0,5 µM de chacune des amorces NifHF (5'-TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA-3') et NifHI (5'-AGCATGTCYTCSAGYTCNTCCA-3') (Laguerre *et al.*, 2001). Les conditions PCR ont été les suivantes : 4 min à 94 °C, 35 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min à 53.5 °C, et 2 min à 72 °C, et finalement 15-min à 72 °C.

Pour mettre en évidence et quantifier la production d'AIA par les souches bactériennes, le réactif de Salkowski (1 ml FeCl<sub>3</sub> à 0,5 M dans 50 ml de HClO<sub>4</sub> à 35%) est utilisé. La méthode est inspirée du protocole de Barillot (2012). Neuf ml de LB-tryptophane à 500 mg.l<sup>-1</sup> sont inoculés par 200 µl de suspension bactérienne issue du congélateur. L'incubation se fait à 30 °C pendant 108 h sur une table d'agitation à 120 rpm, à l'abri de la lumière, car les composés auxiniques sont photodégradables. Ensuite, 2 ml de la suspension sont prélevés et centrifugés à 6000 g pendant 10 min. Puis, 100 µl du surnageant sont récupérés et additionnés de 5 µl d'acide orthophosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM) et de 200 µl du réactif de Salkowski. L'ensemble (en plaque de microtitration) est mis à incuber 25 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Une mesure de l'absorbance à 535 nm est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre en plaque. Une réaction qui tend vers le rose foncé implique une forte production d'auxine. La concentration en AIA est déterminée par une gamme étalon d'AIA pure, préparée dans du LB-tryptophane à 500 mg.l<sup>-1</sup>. Une solution mère d'AIA à 100 mg.l<sup>-1</sup> de milieu LG-tryptophane est réalisée tout en prenant soin de pré solubiliser l'AIA dans 0,5 ml d'éthanol absolu. A partir de la solution-mère d'AIA, il convient de préparer 10 ml de solution fille d'AIA à 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 et 100 mg.l<sup>-1</sup>.

La production de sidérophores est estimée à l'aide de la gélose chrome azurole S (CAS). Pour préparer la gélose CAS, quatre solutions doivent être réalisées en parallèle, stérilisées et maintenues à 50 °C séparément, avant d'être mélangées dans un ordre précis, en prenant soin de garder le mélange en surfusion.

Les 4 solutions sont détaillées ci-dessous, il faut ajouter la solution 3 (70 ml) à la 2 (800 ml) puis, ajouter la 4 (30 ml). Enfin, il convient d'ajouter la solution 1 (100 ml) avec une agitation suffisante pour mélanger sans créer de bulle dans le mélange (1000 ml).

Solution 1 : 100 ml de solution indicatrice Fe-CAS

- ✓ 10 ml de la solution Fe(III) :  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1 mM soit 2,7 mg dans 10 ml) + HCl (10 mM soit 20  $\mu\text{l}$  d'une solution mère à 5 M dans 10 ml)
- ✓ 50 ml de solution de chrome azurol S : CAS (1,21  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  soit 60,5 mg CAS dans 50 ml d'eau distillée)
- ✓ 40 ml d'Hexadecyltrimethylammonium : HDTMA bromide (1,82  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  soit 72,8 mg dans 40 ml d'eau distillée)
- ✓ Autoclaver et maintenir à 50 °C

Solution 2 : 800 ml de solution tampon principale

- ✓ 750 ml de solution saline : 0,3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 0,5 g NaCl + 1,0 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  diluée dans de l'eau distillée
- ✓ Diluer 30,24 g de PIPES (piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic acid]) dans la solution saline
- ✓ Ajuster le pH à 6,8 avec KOH à 50% (50 g dans 100 ml)
- ✓ Quantité suffisante d'eau distillée pour 800 ml
- ✓ Ajout de 15 g d'agar
- ✓ Autoclaver et maintenir à 50 °C

Solution 3 : 70 ml de solution Tampon auxiliaire

- ✓ Dans 70 ml d'eau distillée : 2,0 g de glucose + 2,0 g de manitol + 493 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  + 11 mg  $\text{CaCl}_2$  + 1,17 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  + 1,4 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$  + 0,04 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  + 1,2 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  + 1 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- ✓ Autoclaver et maintenir à 50 °C

Solution 4 : 30 ml de solution de casaminoacide 10% (w/v)

- ✓ A 3 g d'hydrate de caséine ajouter 30 ml d'eau distillée
- ✓ Filtrer pour stériliser (0,2 $\mu\text{m}$ ).

La gélose CAS est coulée dans une boîte de Pétri puisensemencée par une souche bactérienne, sous forme de 3 gouttes de 2  $\mu\text{l}$  de suspension bactérienne issue d'une culture de 48 h dans du NB (8 g pour un litre d'eau distillée). Après 5 j d'incubation à 30 °C, un halo rouge-orangé autour de la colonie bactérienne atteste de la production de sidérophores. La coloration bleue initiale du milieu est liée au complexe [Fe-CAS] stabilisé par le HDTMA (Hexadecylmethylammonium) bromide, tandis que la coloration orangée finale est liée au complexe [Fe-Sidérophore]. Le diamètre du halo est mesuré et exprimé en millimètre.

$$\text{Intensité de production de sidérophores} = \frac{\text{diamètre du halo}}{\text{diamètre de la colonie}}$$

Pour déterminer la solubilisation de phosphate, la gélose de Pikovskaya, supplémentée en tricalcium de phosphate (TCP 5  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), est coulée dans une boîte de Pétri, puisensemencée par une souche bactérienne, sous forme de 3 gouttes de 2  $\mu\text{l}$  de suspension bactérienne. Cette dernière est issue d'une culture de 48 h dans du LB à 27 °C et ajustée à une DO = 0,25 dans du PBS. La gélose devient opaque lors de la réaction de solubilisation du phosphore. Le halo se

formant autour de la colonie est alors mesuré ainsi que le diamètre de la colonie bactérienne. L'intensité de la solubilisation du phosphate est exprimée selon le rapport suivant :

$$\text{Intensité de solubilisation des phosphates} = \frac{\text{diamètre du halo}}{\text{diamètre de la colonie}}$$

### 3.3.2.5 Préparation de l'inoculum et pré-culture des poivrons

Des poivrons sont inoculés, ou non, par un consortium bactérien au niveau de leur phyllosphère et directement dans le sol à proximité des racines, tout en étant exposés, ou non, à une atmosphère enrichie en Hg. Pour ce faire, il a fallu préparer les inocula bactériens, cultiver des poivrons et préparer des phytotrons pour mener l'expérience en conditions contrôlées.

Deux inocula sont produits, l'un à partir du consortium des 4 souches isolées depuis la phyllosphère et l'autre à partir des 4 souches isolées de la rhizosphère et le sol. Les souches sélectionnées sont celles les plus résistantes au Hg et possédant des traits promoteurs de croissance. Dans la phyllosphère, il s'agit des souches AT3, AT7, AT8 et AT9, toutes étant identifiées comme des *Pseudomonas graminis*. Ce consortium est dénommé «consortium phyllosphérique (CP). Pour la rhizosphère, ce sont deux *Pseudomonas sp.* (FT79 et FT82) et dans le sol ce sont deux *Bacillus subtilis* (FT97 et FT50). Ce consortium est dénommé consortium rhizosphérique (CR). Les 8 bactéries alors conservées à -80 °C sont incubées dans 100 ml de milieu riche 864, à l'intérieur d'une fiole de 500 ml, durant 24 h à 30 °C, à 200 rpm pour atteindre saturation du milieu. Puis 0,5 l des consortia CP et CR sont préparés dans des milieux PBS pour que chaque souche soit ajustée à une DO de 0,25 avant l'inoculation.

Les graines de poivrons ont été semées dans un bac avec du terreau (Bril, Allemagne) le 18/02/2017 (t0), puis transplantées individuellement dans une plaque 77 puits le 05/04/2017 (t46), ensuite transférées dans des pots de 0,5 l contenant du terreau le 25/04/2017 (t66) en vue de l'inoculation le 27/04/2017 (t68 ; T0) (Figure 58). Le « t » représente l'âge du poivron en jours et le « T » représente le nombre de jour depuis le début de l'expérience.



Figure 58 : Les poivrons à t0 (à gauche), à t46 (au centre) et à t68 dans le phytotron avec l'atmosphère enrichie en Hg (à droite).

### 3.3.2.6 Expérience en conditions contrôlées

Le dispositif expérimental se divise en quatre modalités, deux par phytotrons, une par étage de phytotron et 16 poivrons (répétitions) par modalités :

- ✓ 16 poivrons : inoculum / atmosphère enrichie en Hg (i+) – phytotron A
- ✓ 16 poivrons : pas d'inoculum / atmosphère enrichie en Hg (ni+) – phytotron A
- ✓ 16 poivrons : inoculum / atmosphère contrôle (i-) – phytotron B
- ✓ 16 poivrons : pas d'inoculum / atmosphère contrôle (ni-) – phytotron B

Nous utilisons deux phytotrons pour générer deux atmosphères, l'une non contaminée et l'autre enrichie en Hg. Pour apporter du Hg, nous disposons le sol de Tavaux tamisé à 3 mm et arrosé, dont nous avons mesuré l'enrichissement en Hg à T0 ( $6,38 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) dans un des phytotrons. Par ailleurs, nous mesurons la concentration en Hg dans l'atmosphère à l'aide d'un dispositif de pompage, à travers un filtre à charbon actif, durant la 2<sup>nd</sup>e et la 3<sup>ème</sup> semaine de culture. L'atmosphère enrichie en Hg présente une concentration de  $21,00 \text{ ng.m}^{-3}$  dans l'atmosphère tandis que l'atmosphère non contaminée présente une concentration de  $3,48 \text{ ng.m}^{-3}$ . En moyenne, une atmosphère non contaminée devrait contenir entre 1 et  $4 \text{ ng.m}^{-3}$  selon le BRGM (Thomassin & Touze, 2003). Brièvement, une pompe KnF Laboport Neuberger (Allemagne) est reliée à deux filtres de charbon actif et le débit du système est estimé à l'aide d'un débitmètre ( $2,8 \text{ l.min}^{-1}$ ), puis elle est activée pour aspirer à flux constant l'air du phytotron pendant une semaine. Le premier filtre permet d'évaluer la quantité de Hg interceptée et le second est un témoin permettant de vérifier que l'essentiel du Hg est intercepté par le premier filtre (Figure 59).



**Figure 59 : Dispositif de pompage à travers des filtres à charbon actif pour la détection du Hg atmosphérique.**

Les modalités « inoculées » sont arrosées par 4,8 ml de consortium phyllosphérique pulvérisé à l'aide d'un pulvérisateur de jardin stérile, précisément réglé pour vaporiser 0,8 ml par déclenchement (6 vaporisations autour du plan). Ceci permet de former un tapis de gouttes uniformes sur et sous les feuilles de chaque plan. En plus de cette inoculation, les plants sont arrosés au pied par 10 ml de consortium rhizosphérique. Les modalités non inoculées sont arrosées exactement de la même façon avec un milieu PBS sans bactérie.

Les conditions contrôlées au sein des phytotrons suivent le cycle suivant : 22 °C, 250  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , et 60 à 80 % d'humidité pendant 16 h ; puis 18 °C, autour de 0  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et 60 à 80 % d'humidité pendant 8 h.

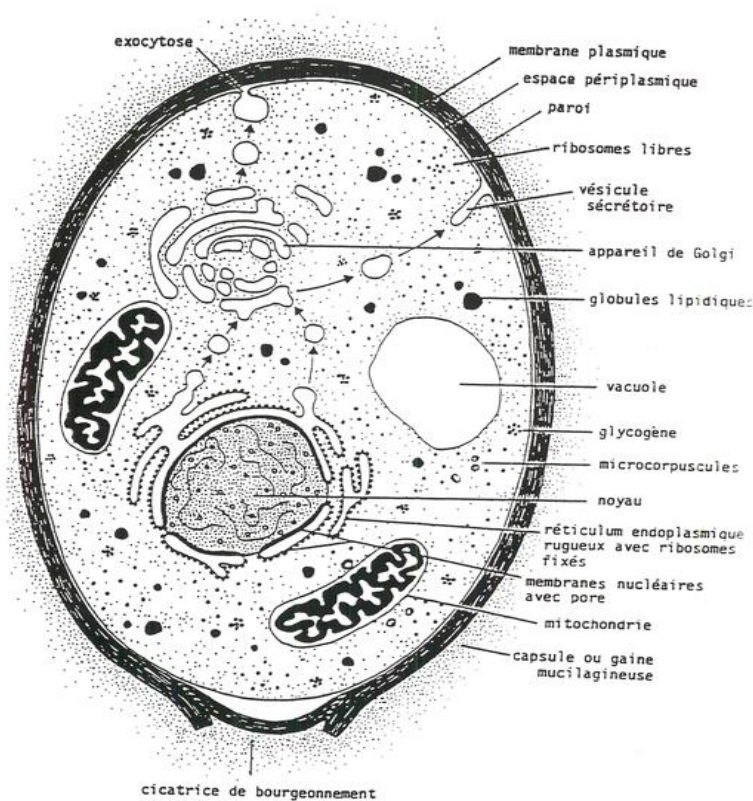
### **3.3.2.7 Analyses sur le poivron**

Les poivrons ont fait l'objet d'un suivi à T0 (t68), T15 (t83) et T32 (t100) de deux paramètres: la concentration de Hg dans les feuilles les plus âgées en excluant la plus basse et la longueur de la tige. A T32 (t100) des fleurs sont également prélevées pour chaque modalité dans l'optique d'évaluer leur concentration en Hg. A T46 (t114) les paramètres évalués sont les suivants : la concentration de Hg dans les feuilles âgées, dans les feuilles jeunes, dans les fruits, dans la tige et dans les racines, mais aussi la longueur de la tige, et les biomasses sèches aériennes, racinaires et totales.

Pour mesurer le Hg dans la biomasse, les différents organes prospectés ont été séchés à température ambiante avant d'être pesés et introduits dans des tubes Eppendorfs de 2 ml. Deux billes en tungstène ont été ajoutées pour broyage au vibrobroyeur (2,5 min à 30 Hz) avant passage à l'AMA 254.

### 3.3.3 Accumulation du Hg dans des champignons modèles

Pour rappel voici la structure générale d'une cellule de champignon, ici une levure<sup>18</sup> :



#### 3.3.3.1 Tolérance au Hg chez *S. cerevisiae* en présence de divers cations

Un criblé des potentielles de compétitions entre le Hg et d'autres cations pour l'utilisation des transporteurs des levures est réalisé. Le test est exécuté à l'aide de plaques de cultures cellulaires à 96 puits, sur lesquelles est réalisé un double gradient, de Hg et de l'ion testé. La levure sauvage stockée -80 °C est utilisée pour démarrer une incubation pendant 16h à 27 °C à 200 rpm dans un milieu YPD supplémenté des cations appropriés en fonction du mutant cultivé. Les solutions de Hg ont été préparées à partir d'une solution de HgCl<sub>2</sub> à 0,1 M, diluée systématiquement dans du milieu de culture YPD. Les solutions des ions testés ont également été préparées en ajoutant l'espèce chimique voulue sous forme solide (anhydre si possible) dans du YPD, puis en filtrant la solution mère obtenue à 0,20 μM afin de la stériliser, avant de la diluer en série dans du YPD. Les ions suivants ont été testés : Ion<sup>2+</sup> (IonCl<sub>2</sub>), Cu<sup>2+</sup> (CuSO<sub>4</sub>), Fe<sup>3+</sup> (FeCl<sub>3</sub>), Ni<sup>2+</sup> (NiCl<sub>2</sub>), Zn<sup>2+</sup> (ZnSO<sub>4</sub>), Mn<sup>2+</sup> (MnCl<sub>2</sub>) et K<sup>+</sup> (KCl). Un gradient de concentrations adaptées à l'ion testé (entre 0 et 1 mM pour les ETM, entre 0 et 340 mM pour les autres métaux) est réalisé perpendiculairement au gradient de Hg dans chaque plaque. Une

<sup>18</sup> <http://www.abmauri.fr/levure-de-panification-definition-et-description.html>

suspension de *S. cerevisiae* (souche BY4741 sauvage) y est ajoutée au dernier moment afin d'éviter un stress salin avant le début de l'expérience, en volume suffisant pour que la  $DO_{600}$  finale dans les puits soit de 0,1. Puis, 100  $\mu$ l de chaque préparation sont ajoutés selon les gradients prévus dans les puits de la plaque à 96 puits. L'expérience est réalisée en triplicats. La  $DO$  à 595 nm dans les puits a été mesuré à  $t = 0$ , puis les plaques ont été placées dans une étuve à 27 °C à l'obscurité pendant 16 h pour incubation. La  $DO_{595}$  est ensuite mesurée à  $t = 16$ , et la  $DO$  initiale y est soustrait pour obtenir la turbidité causée par le développement des levures.

### **3.3.3.2 Mutations de gènes de transport transmembranaire et effet sur l'accumulation du Hg chez *S. cerevisiae***

Les levures sauvages et mutantes sont exposées pendant une période courte au Hg sous forme  $HgCl_2$  dans un milieu contrôlé, avant qu'une mesure de la concentration en Hg dans la biomasse soit réalisée. Les levures stockées à -80 °C sont utilisées pour démarrer une incubation pendant 16h à 27 °C à 200 rpm dans un milieu YPD supplémenté des cations appropriés en fonction du mutant cultivé. Ensuite, la levure est lavée à trois reprises avec du milieu minimum (Glucose 20 g,  $(NH_4)_2SO_4$  5 g,  $KH_2PO_4$  1 g,  $MgCl_2$  95.2 mg, NaCl 0.1 g,  $CaCl_2$  0.1 g, solution de TE 1 ml et solution de vitamines 1 ml par litre, pH 7 ; Trace elements 1000 $\times$ : acide borique 500 mg,  $CuSO_4 \cdot 5(H_2O)$  40 mg, KI 100 mg,  $FeCl_3$  200 mg,  $MnSO_4$  400 mg,  $Na_2MoO_4$  200 mg,  $ZnSO_4 \cdot 7(H_2O)$  400 mg par litre, pH 7 ; vitamines 1000 $\times$ : pyridoxine HCl 400 mg, thiamine HCl 400 mg, 200 mg riboflavine, biotine 2 mg, Ca-panthitenate 400 mg, acide folique 2 mg, inositol 2 g, acide nicotinique 400 mg, acide p-aminobenzoïque 200 mg par litre pH 7), puis la suspension de souches est ajustée à une  $DO_{600}$  de 0,8. La  $DO_{600}$  est la densité optique à 600 nanomètre qui est une mesure de la turbidité du milieu, liée à la quantité de cellules (vivantes ou mortes) dans le milieu. Les cellules sont alors incubées à 27 °C à 200 rpm pendant 4 h en tube Eppendorf de 2 ml dans le milieu minimum enrichi de 10  $\mu$ M de  $HgCl_2$ . A la fin de la période d'incubation, les levures sont lavées trois fois avec du PBS. Une dilution en cascade est amorcée avec un des réplicats exposé au Hg puis les dilutions  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  sont étalées sur un milieu gélosé pour dénombrement des UFC. Après 48 h d'incubation à 30 °C nous avons déterminé la cultivabilité des levures par la mesure des UFC.ml<sup>-1</sup>. En parallèle, les mesures du Hg total dans les suspensions de levure dans le PBS sont effectuées à l'aide de l'AMA 254. Un témoin négatif est réalisé à partir du surnageant de PBS après la dernière centrifugation et avant le mise en suspension du culot. De plus, la souche sauvage BY4741 et mutante pour le transport de magnésium ScGeneX/2 a été exposée au Hg pendant une durée de 4 h, cependant, cette fois,



le milieu minimum est non seulement enrichi en Hg mais aussi avec diverses concentrations de Mg. Finalement, le Hg total qui est transporté dans la cellule est mesuré à l'aide de l'AMA 454.

### 3.3.3.3 Détermination de la CMI et de la capacité d'accumulation du Hg par les souches sauvage *PaWT*, mutant *Pa GeneX<sup>A</sup>* et recombinant [*Pa GeneX<sup>A</sup> Pa GeneX<sup>+</sup>*] de *P. anserina*

Pour mener ces expériences, le mycélium du champignon *P. anserina* est pré cultivé sur un milieu M2 gélosé pendant 2 semaines à 25 °C (Figure 60).



Figure 60 : *Podospora anserina* souche sauvage mat+ en boîte de Pétri contenant le milieu M2 gélosé.

Prenons note que bien que le mutant présentent un temps de latence plus important lors de l'incubation (environ 4 jours de retard sur le sauvage) il n'est pas nécessaire d'ajouter du Ion dans le milieu. Ensuite, un disque de mycélium de 0,5 cm est prélevé à la périphérie du champignon. Pour déterminer la concentration minimum inhibitrice (CMI) de la croissance du champignon en présence de Hg, le disque découpé, aussi appelé implant mycélien, est transféré dans les puits d'une plaque de culture cellulaire stérile de 12 puits de 3,5 cm<sup>2</sup> de diamètre. Les trois GT du champignon sont alors exposer à 0, 5, 10, 20, 30, 50, 75 et 100, 125, 150, 175 et 200 μM de HgCl<sub>2</sub> dans un milieu malt durant 10 jours avant d'évaluer à l'œil nu le niveau de développement du champignon et des trois réplicats réalisés. Les mycéliums exposés aux concentrations 0, 5, 10, 20 et 30 μM de HgCl<sub>2</sub> sont rincés avec du PBS et vont être utilisés pour une évaluation de l'accumulation du Hg. Une manipulation parallèle implique des plaques à 6 puits de 9,6 cm<sup>2</sup> et les trois phénotypes poussant 8 j dans un milieu M2 enrichi par 10 μM de HgCl<sub>2</sub>, elle aussi pour but de déterminer l'accumulation du Hg chez les trois phénotypes avec plus de réplicats de l'expérience. Brièvement, après la période d'incubation le mycélium est rincé par trois lavages successifs dans le tampon PBS, puis séché à température ambiante durant 5 j. Bien que les temps de séchage soit plus long à température ambiante qu'à l'étuve, le Hg a une pression de vapeur saturante (parfois dite tension de vapeur) élevée qui implique son passage d'un état solide ou liquide vers l'état gazeux à faible température. Il est donc préférable

de ne pas chauffer la biomasse pour éviter des pertes du Hg. Une fois sec le mycélium est broyé par un vibrobroyeur (30 Hertz) à l'aide de billes en tungstène. Une série de dilutions de la poudre homogène est réalisée jusqu'au 1/10 000<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée puis les échantillons sont analysés à l'AMA 254 pour l'ensemble des 6 réplicats de 100 µl.

#### **3.3.3.4 Effet d'inhibiteurs métaboliques sur l'accumulation du Hg par P. anserina**

Le phénotype sauvage du champignon est pré-incubé dans 40 ml de milieu M2 pendant deux semaines à 23 °C dans des pots stériles de 100 ml. Puis cette incubation va être perturbée par l'ajout de HgCl<sub>2</sub> 10 µM et l'ajout d'inhibiteurs métaboliques ou d'une modification de la température d'incubation:

- 20 µM d'hexamine (III) cobalt chloride (HCC) un inhibiteur spécifique des transports CorA Ion<sup>2+</sup> (Bleackley *et al.*, 2014)
- 10 µM de carbonyl cyanide m-chlorophenylidrazone (CCCP) (Chalot *et al.*, 1996)
- 10 µM de 2,4-Dinitrophénol (DNP) (Chalot *et al.*, 1996)
- incubation à une température de 4 °C

Après 16 h de perturbation, le mycélium est rincé 3 fois au PBS, séché 5 j à température ambiante avant d'être broyé à l'aide du vibrobroyeur et de billes de tungstène et dilué pour doser le Hg accumulé dans le champignon à l'aide de l'AMA 254 et pour les trois réplicats.

#### **3.3.3.5 Détermination de la compartimentation cellulaire du Hg chez P. anserina**

Le suivi de la cinétique de désorption du Hg observé dans l'organisme de *Podospora anserina* en fonction du temps nous permet d'estimer dans quels organites se retrouve le Hg dans la cellule de champignon. Notre expérimentation permet de répartir le Hg total dans trois compartiments cellulaires :

- sur la paroi et dans l'espace périplasmique
- dans le cytoplasme
- dans la vacuole

Un implant mycélien est introduit dans 40 ml de milieu M2 est une incubation dure 20 j à 25 °C. Ensuite, deux expériences similaires sont réalisées pour exposer le mycélium au HgCl<sub>2</sub>. D'une part, le mycélium sans l'implant est placé dans 6 pots contenant 40 ml de tampon MES (CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM) enrichis avec 400 µl de Hg à 1000 µM (concentration final 10 µM HgCl<sub>2</sub>). Le mycélium subit alors une exposition courte de 30 min (3 pots) et une exposition longue de 16 h (3 pots), le tout à 23 °C. D'autre part, le mycélium sans l'implant est placé dans 6 pots contenant 40 ml de tampon MES (CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM) enrichi avec 250 µl de Hg à 1000 µM (concentration final 6,25 µM HgCl<sub>2</sub>), et dans 3 des 6 pots nous avons introduit 500 µl de

l'inhibiteur Hexamine (III) Cobalt Chloride (HCC) à 1000  $\mu\text{M}$  (concentration finale 12,5  $\mu\text{M}$  de HCC). Cette fois les pots sont incubés 16 h à 23 °C.

Avant de réaliser la désorption après exposition au Hg, nous avons préalablement filtré le mycélium, 3 fois, avec du tampon MES ( $\text{CaCl}_2$  0,5 mM) pour enlever le milieu. Puis le champignon est transféré dans 40 ml de tampon MES ( $\text{CaCl}_2$  5 mM) maintenu à 4 °C. Ensuite, la cinétique de désorption est suivie grâce au prélèvement de 200  $\mu\text{l}$  de tampon MES ( $\text{CaCl}_2$  5 mM) aux temps adéquats : 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 390, 480, 600 min après le premier prélèvement. Chaque échantillon est placé dans un tube Eppendorf 2 ml à 4 °C. Au temps t600, nous avons récupéré les champignons pour les rincer, 3 fois avec du tampon MES ( $\text{CaCl}_2$  0,5 mM), pour les introduire dans des tubes Eppendorf préalablement pesés. Les tubes Eppendorf sont placés 4 j sous la hotte à flux lumineuse à température ambiante pour le séchage. Lorsque le séchage est terminé, les tubes Eppendorf contenant les champignons sont pesés pour obtenir la masse totale. Le mycélium est broyé à l'aide du vibrobroyeur et de billes en tungstène et dilué pour doser le Hg accumulé dans le champignon à l'aide de l'AMA 254 et pour les trois réplicats.

Lorsque le séchage est terminé, les tubes Eppendorfs contenant les champignons sont pesés pour obtenir la masse totale. Le mycélium est broyé à l'aide du vibrobroyeur et de bille de tungstène et dilué pour doser le Hg accumulé dans le champignon à l'aide de l'AMA 254 et pour les trois réplications.

### **3.3.3.6 Mesure de la fixation du Hg aux thiols chez *P. anserina***

La propension de *P. anserina* a fixé le Hg sur des groupements sulfhydryle (-SH) a été testée en employant une méthode inspirée de la thèse de Mohamad Assad (Assad, 2017) qui révèle la quantité de Hg piégé sous forme S-Hg-S dans la portion protéique du champignon. Pour mener cette expérience, le mycélium du champignon *P. anserina* est pré-cultivé sur un milieu M2 gélosé pendant 2 semaines à 23 °C avant que des implants mycéliens (trois réplicats) soient transférés dans un milieu M2 liquide et incubés 20 j à 25 °C. Puis le champignon est exposé pendant 16 h à 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$  avant d'être rincé 3 fois au PBS et conservé à -80 °C. L'équivalent de 70 mg de masse sèche de *P. anserina* congelé est alors réduit en poudre à l'aide d'un vibrobroyeur et de billes en tungstène dans un tampon d'extraction protéique (pH 8) maintenu à 4 °C contenant : du Tris-HCl 50 mM, l'inhibiteur de protéase fluorure de phénylméthylsulfonyl PMSF, 2mM et du polyvinyl-polypyrrolidone (PVPP) 5mg. L'extrait protéique brut obtenu est alors successivement agité à 120 rpm 15 min, exposé aux ultrasons 10 min, centrifugé à 30 000 g durant 10 min à 4 °C, filtré à l'aide d'une gaze et enfin filtré à 22

$\mu\text{m}$  sur une membrane stérile (Milex<sup>®</sup>-GS, Cork, Irlande). Ensuite, 0,5 ml d'extrait protéique est précipité dans 0,5 ml d'acide trichloroacétique (TCA, 10 % m:v) avec ou sans (DTT, 2 mM). Le mélange homogénéisé est alors laissé 1 h à 4 °C avant d'être centrifugé à 30 000 g durant 10 min à 4 °C. Deux réplicats sont réalisés par modalités (avec et sans DTT). Finalement, surnageant et précipité sont séparés. Le DTT est utilisé pour réduire les ponts disulfures des protéines et empêche la formation de ponts disulfures intra et intermoléculaires. Ainsi, les ponts S-Hg-S doivent libérer le Hg vers le surnageant en présence de DTT, tandis qu'en l'absence de DTT les ponts sont toujours stables et le Hg est contenu dans le précipité protéique. Pour les dosages à l'AMA 254 du Hg et de la quantité de protéine dans le compartiment protéique précipité, une solubilisation est nécessaire à l'aide d'une solution O'Farrells adaptée (Giavalisco *et al.*, 2003) : urée (9,5 M), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 mM), dodécylsulfate de sodium (SDS, 1.25% m:m), et Tween 80 (5% v:v). Le culot protéique est dissout dans 1 ml de la solution O'Farrells adaptée sous agitation au vortex puis 15 min d'ultrason.

Le dosage de la quantité de protéine est réalisé à l'aide de la méthode de Bradford. Une courbe de calibration est effectuée avec de la sérumovalbumine (BSA) à 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 et 2000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . La concentration en protéines totales a été estimée à l'aide d'un kit (Coomassie Bradford Protein Assay kit, Thermo Scientific). La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique qui utilise comme réactif le bleu de Coomassie, basé sur la mesure de l'absorbance à 595 nm. En détail, ce sont 30  $\mu\text{l}$  d'extrait protéique qui sont ajoutés dans 1,5 ml de réactif de Coomassie et l'intensité du bleu produit par la réaction est mesurée par une lecture en triplicats de la densité optique (DO), le blanc étant réalisé à l'aide du Tris-HCl du tampon d'extraction. Par ailleurs, le dosage du Hg dans des échantillons de 100  $\mu\text{l}$  est réalisé à l'aide de l'AMA 254. Les dosages sont effectués sur le mycélium sec initial ; le culot et le surnageant protéique après centrifugation et avant filtration ; le culot et le surnageant protéique après précipitation TCA/DTT ; le culot et le surnageant protéique après précipitation TCA.

### **3.3.4 Méthodes générales**

#### **3.3.4.1 Analyses statistiques**

Les analyses statistiques permettant de discriminer de façon significative des groupes de valeurs sont réalisées sur R Commander. Après avoir récolté les données et les avoir organisées dans un fichier de type tableur, il est nécessaire de tester l'homoscédasticité des variances et la distribution normale des valeurs. Dans la majorité des cas nous utilisons le test de Bartlett pour déterminer l'homoscédasticité puisqu'il est à utiliser lorsque l'échantillonnage représente peu d'individus, dans le cas contraire ce sera le test de Levene qui sera préféré. Dans

le cas d'un résultat non significatif la normalité a été testée par le test de Shapiro, qui, s'il est lui aussi non significatif, implique que les données sont paramétriques. Dans le cas de données paramétriques un test ANOVA (ANalysis Of VAriance) à un facteur est le plus souvent utilisé. Dans le cas d'un résultat significatif pour l'homoscédasticité ou la normalité, les données peuvent être transformées par des opérations simples de type  $\log_{10}$ . En cas de données résolument non paramétriques le test statistique employé a été celui de Kruskal-Wallis.

### 3.3.4.2 Dosage du Hg

Les analyses ont été réalisées avec l'AMA 254 (Advanced Mercury Analyser) qui est un spectromètre d'absorption atomique (Figure 61).



Figure 61 : Analyseur de Mercure Avancé (AMA) 254.

Les poudres lyophilisées de sol, de racines, de tiges et de feuilles utilisées pour l'extraction d'ADNe précédemment décrite, ont été dosées pour leur concentration en Hg. La lyophilisation a été choisie car elle permet de conserver les ADNe précédemment extraits mais également de limiter la volatilisation du Hg par rapport aux autres techniques de séchage (Hojdová *et al.*, 2015). L'AMA présente une limite de détection de l'ordre de 0,01 ng de Hg, ce qui permet la mesure précise d'échantillons présentant de faibles concentrations en Hg. Les échantillons sont déposés dans des nacelles en nickel, préalablement nettoyées par calcination au bec Bunsen pour éliminer toute trace de Hg, le Hg se volatilisant à des températures élevées. Les conditions utilisées sont celles recommandées par le constructeur : 45 sec de séchage, 150 sec de chauffage et 45 sec de refroidissement. Avant chaque passage des échantillons, il est important d'effectuer 3 blancs (nacelles vides) et 2 étalons. Deux nacelles contenant chacune environ 100 mg de feuilles de tabac certifiées (CRM) « Oriental Basma Tobacco Leaves » (INCT-OBTL-5), avec un contenu en Hg de  $20.9 \pm 1.3 \text{ ng.g}^{-1} \text{ MS}$ , permettent de vérifier la justesse et la répétabilité des analyses.

Le principe est le suivant : un volume fixe (100  $\mu$ l) de chaque échantillon dans une nacelle (contenance maximum : 500  $\mu$ l ou 500 mg) est introduit dans un tube catalytique. Ensuite, un four permet un séchage et une décomposition sous oxygène à 850 °C environ. Le Hg va alors se volatiliser et être entraîné par l'oxygène vers la sortie du tube catalytique pour être piégé sur un amalgameur en or. L'amalgame sera par la suite chauffé pendant un temps très court, avant d'être refroidi, ce qui va libérer des vapeurs de Hg qui seront dirigées vers la cellule de mesure chauffée à température constante. Les atomes de Hg vont absorber une radiation qui est émise pour une lampe du système photométrique, ce qui permettra de les doser, à partir d'une gamme étalon qui a été fournie avec l'appareil. Le filtre isole la raie spectrale correspondant à 253.65 nm, c'est cette longueur d'onde qui caractérise le Hg et donne son nom à l'appareil. Les résultats sont transmis à l'ordinateur qui donne la valeur de l'absorbance et la concentration calculée à partir du poids ou du volume préalablement renseigné.

## Chapitre 4 : préambule

---

aboveground (75) abundance (48) analysis (38) anserina (40)  
bacteria (62) **bacterial** (122) belowground (70)  
cerevisiae (46) **communities** (136)  
concentrations (57) conditions (44) data (44) different (52)  
diversity (59) dna (38) **fungus** (76) fungi (52) gene (44) growth (41)  
**habitats** (244) **hg** (326) hgcl (50) incubation (38)  
inoculated (35) **isolated** (67) kh (34) kruskal-wallis (38) **leaf** (77)  
medium (59) microbial (37) number (40) **otus** (162)  
phyllosphere (55) **plant** (97) poplar (61) previously (36) results (36)  
**root** (113) **samples** (124) **sequences** (99)  
significant (35) site (37) **soil** (141) stem (82) **strains** (121)  
study (56) transport (47) tree (41) unassigned (44) uptake (62)

*Analyse sémantique de la totalité du chapitre 4*





## 4. RESULTATS ET DISCUSSION

### 4.1 Préambule

Ce chapitre « résultats et discussion » me fournit l'opportunité de revenir sur l'ensemble des résultats valorisés lors de ma thèse avec la collaboration de nombreuses et de nombreux scientifiques, que ce soient les stagiaires avides de bien faire ou les plus aguerris des professeur(e)s. Ici, je vais tenter de présenter le fil conducteur entre l'ensemble de mes recherches, montrer les résultats publiés ou en préparation pour publication, discuter plus avant des conclusions qui en ont été tirées et présenter quelques perspectives de recherches. Ce chapitre est présenté sous forme de trois parties, chacune illustrée par un manuscrit dont je suis l'auteur et qui est publié ou en cours de publication ou de soumission au moment de la rédaction de cette thèse.

Dans la première partie, je présenterai ma contribution à l'exploration des communautés de microorganismes dans leur environnement « naturel » (par opposition à l'étude en conditions contrôlées) avec l'appui d'une première publication :

- **Durand Alexis**, Maillard F., Foulon J., Gweon H. S., Valot B., Chalot M. (2017). « **Environmental metabarcoding reveals contrasting belowground and aboveground fungal communities from poplar at a Hg phytomanagement site** » publiée dans *Microbial Ecology*.

Toujours pour alimenter ce propos, je mentionnerai ici deux publications auxquelles j'ai participé en tant que co-auteur :

- Foulon Julie, Zappelini C., **Durand A.**, Valot B., Blaudez D., Chalot M. (2016). « **Impact of poplar-based phytomanagement on soil properties and microbial communities in a metal-contaminated site** » publiée dans *FEMS microbiology ecology*.
- Foulon Julie, Zappelini C., **Durand A.**, Valot B., Girardclos O., Blaudez D., Chalot M. (2016). « **Environmental metabarcoding reveals contrasting microbial communities at two poplar phytomanagement sites** » publiée dans *Science of The Total Environment*.

Cette partie a pour ambition de répondre au premier objectif à savoir : *i) Obtenir une meilleure compréhension des communautés microbiennes (champignons et bactéries) associées à la phyllosphère (feuilles et tiges) et à la rhizosphère (racines et sol) d'un ligneux (Populus trichocarpa x Populus maximowiczii) planté sur un sol enrichi en Hg (moyenne de 5,5 ppm) dans un contexte industriel, au moyen des technologies de séquençage d'ADN environnemental haut débit Illumina MiSeq.*

La seconde partie illustrera la démarche choisie pour isoler, identifier, caractériser et évaluer l'efficacité des organismes d'intérêt (PGPB) dans le cadre de la plantation de peupliers cultivés sur le sol de Tavaux enrichi en Hg. Pour ce faire, je propose d'exposer le sujet de ma seconde publication intitulée :

→ **Durand Alexis**, Maillard F., Alvarez-Lopez V., Gunichard S., Berteau C., Valot B., Blaudez D., Chalot M. (2017). « **Bacterial diversity associated with poplar trees grown on a Hg-contaminated site: community characterization and isolation of Hg-resistant plant growth-promoting bacteria.** » soumis à *Science of The Total Environment*.

Une part de la mise au point des techniques utilisées dans cette publication s'appuie sur des travaux précédents qui ont fait l'objet d'une autre publication disponible sur internet dont je suis l'auteur :

→ **Durand Alexis**, Piutti S., Rue M., Morel J. L., Echevarria H., Benizri E. (2016). « **Improving nickel phytoextraction by co-cropping hyperaccumulator plants inoculated by plant growth promoting rhizobacteria** » publiée dans *Plant and Soil*.

Cette partie doit répondre à l'objectif indiqué précédemment à savoir : *ii) Isoler et caractériser des microorganismes résistants au Hg et qui possèdent des propriétés fonctionnelles bénéfiques pour les plantes, sur ces mêmes peupliers de la plantation de la friche industrielle enrichie en Hg, étudiée lors du premier objectif.*

La dernière partie vise à présenter mes travaux les plus récents dans le domaine du transport du Hg par les microorganismes qui participent à la compréhension globale du cycle du Hg dans la biogéosphère. Cette partie repose sur des données en cours de validation et qui vont être soumises à un comité de relecture pour publication. La partie s'articule autour du texte dont le titre est le suivant : « **The Plasma membrane transporter GeneX is required for Hg uptake in fungal cells** »

Cette partie veut répondre à l'objectif suivant : *iii) Etudier les mécanismes d'accumulation du Hg par les microorganismes et plus spécifiquement par les champignons dont certains l'accumulent plus efficacement, en utilisant des champignons modèles (*S. cerevisiae* et *P. anserina*).*

Une ultime partie viendra conclure ce manuscrit de thèse pour condenser, expliciter davantage et intégrer au mieux dans leur contexte les résultats marquants obtenus lors de ces trois années de travail.

## Chapitre 4 : première partie

---

aboveground (37) abundance (30) analysis (24) assignment (17)  
belowground (29) class (14) clustering (14) communautes (19)  
**communities** (63) concentration (19) connections (18)  
correlations (27) data (17) dataset (13) different (14) **diversity** (32) dna (14)  
dothideomycetes (13) exclusion (13) **fungus** (62) **fungi** (33) groups (16)  
**habitats** (117) hg (62) important (12) indices (20) interactions (14) kruskal-  
wallis (23) **leaf** (46) leaves (16) microbial (19) microorganismes (12) **network** (32)  
**otus** (103) phyllosphere (14) plants (13) poplar (36) relative (13) **richness** (17)  
**root** (65) **samples** (80) **sequences** (50) **soil** (68)  
species (17) **stem** (39) strains (13) study (21) trees (23) **unassigned** (44)  
yeast (13)

*Analyse sémantique du chapitre 4 : première partie*



## 4.2 L'ADN environnemental, le bon intermédiaire pour décrire les communautés de microorganismes dans leur habitat et pour déceler les effets du Hg à l'échelle de la communauté ?

### 4.2.1 Contexte et publication

La phyllosphère est un milieu moins étudié que la rhizosphère dans le domaine scientifique comme peut le montrer cette recherche rapide sur le moteur de recherche Google Scholar :

Recherche dans Google Scholar	Nombre de hits total		
	Année 2014	Année 2015	Année 2016
« rhizosphere »	216 000	236 000	271 000
« phyllosphere »	12 700	13 500	15 200

Pourtant, c'est un milieu important pour les écosystèmes et qui comporte de nombreux habitats pour les microorganismes. Ces habitats diffèrent grandement de ceux de la rhizosphère et il semble important de décrire davantage les communautés de microorganismes de ces habitats qui pourraient héberger des microorganismes spécifiques. Par ailleurs, nos connaissances sur les effets du Hg sur les microorganismes sont souvent datées et les changements au sein des communautés de microorganismes impliqués par des pollutions environnementales au Hg sont très limités, comme j'ai pu le montrer dans l'introduction (voir chapitre 1 : 1.4).

Le séquençage de l'ADN environnemental des microorganismes dans leur habitat permet de décrire la structure et la composition de ces écosystèmes à un temps « t ». Ainsi, la friche industrielle de Tavaux dont le sol est contaminé par le Hg et où une peupleraie a été implantée avec succès en 2011 m'a donné l'occasion d'étudier en parallèle les communautés de champignons et de bactéries dans quatre habitats très distincts (sol, racines, tiges et feuilles) de peuplier (*Populus trichocarpa* X *Populus maximowiczii*) et d'étudier les effets du Hg à l'échelle de la communauté. La publication qui suit se concentre sur les communautés de champignons. Les communautés de bactéries ont également été décrites par séquençage et les résultats sont dans la seconde publication. Cependant, cette seconde publication est utilisée pour servir un autre propos que je développe dans la partie 2.

## Environmental metabarcoding reveals contrasting belowground and aboveground fungal communities from poplar at an Hg phytomanagement site

Alexis Durand<sup>a</sup>, François Maillard<sup>a</sup>, Julie Foulon<sup>a</sup>, Hyun S. Gweon<sup>b</sup>, Benoit Valot<sup>a</sup>, Michel Chalot<sup>a, c\*</sup>



Fungal diversity in soil, root, stem and leaf habitats of a poplar plantation on a mercury contaminated soil.

<sup>a</sup> *Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France*

<sup>b</sup> *Centre for Ecology & Hydrology, Maclean Building, Benson Lane, Crowmarsh Gifford, Wallingford, Oxon OX10 8BB, UK*

<sup>c</sup> *Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France*

**\*Corresponding author:** Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France

Tel: +33 3 81 99 46 76,

Email: [Michel.chalot@univ-fcomte.fr](mailto:Michel.chalot@univ-fcomte.fr)

## Abstract

Characterization of microbial communities in stressful conditions at a field level is rather scarce, especially when considering fungal communities from aboveground habitats. We aimed at characterizing fungal communities from different poplar habitats at a Hg-contaminated phytomanagement site by using Illumina-based sequencing, network analysis approach and direct isolation of Hg resistant fungal strains. The highest diversity estimated by the Shannon index was found for soil communities, which was negatively affected by soil Hg concentration. Among the significant correlations between soil OTUs in the co-occurrence network, 80 % were negatively correlated revealing dominance of a pattern of mutual exclusion. The fungal communities associated with *Populus* roots mostly consisted of OTUs from the symbiotic guild, such as members of the *Thelephoraceae*, thus explaining the lowest diversity found for root communities. Additionally, root communities showed the highest network connectivity index, while rarely detected OTUs from the *Glomeromycetes* may have a central role in the root network. Unexpectedly high richness and diversity were found for aboveground habitats, compared to the root habitat. The aboveground habitats were dominated by yeasts from the *Lalaria*, *Davidiella* and *Bensingtonia* genera, not detected in belowground habitats. Leaf and stem habitats were characterized by few dominant OTUs such as those from the *Dothideomycete* class producing mutual exclusion with other OTUs. *Aureobasidium pullulans*, one of the dominating OTUs, was further isolated from the leaf habitat, in addition to *Nakazawaea populi* species, which were found to be Hg resistant. Altogether, these findings will provide an improved point of reference for microbial research on inoculation-based programs of tailings dumps.

**Keywords:** Hg-enriched tailings dump, Hg resistance, internal transcribed spacer metabarcoding, poplar microbiome, Illumina MiSeq, network.

## **Introduction**

Plants in natural and agricultural settings are colonized by a wide range of microbes on both their outer and inner surfaces [1]. Nevertheless, the scientific understanding of the microbial communities of woody species is quite limited, especially for microbes associated with aboveground tissues. Many tree tissues may indeed represent distinct microbial habitats, such as the rhizosphere, the root and leaf endospheres, the episphere of the phyllosphere and fruits, flowers, leaves, buds, stems, branches or even the trunk [2, 3]. Moreover, some of the microorganisms that colonize these habitats establish strong links with their host, whose disruption may result in loss of host fitness [4]. For instance, a certain groups of mycorrhizal fungi that form symbiotic association with the root system are of an importance for tree nutrition and health, as they play key roles in the carbon and nitrogen cycles [5]. In the phyllospheric habitat, archaea, bacteria, filamentous fungi and yeasts have been identified, although less work has been done on the two latter groups of microorganisms [6]. Studies are increasingly indicating that fungi influence the fitness of their host plants, either negatively by acting as pathogens [7], or positively by increasing the stress tolerance of the plant [8], shaping insect herbivory [9] or reducing the infection of plant tissues by pathogens [10].

Trees, as perennials, are made of a variety of habitats that may host contrasted microbial communities, which composition and diversity may vary with season, age, species, and climatic conditions. Therefore, they are relevant models for studying the structure and composition of microbial communities, but until recently, our knowledge has been limited due to the difficulty of adequately describing microbial communities with classical culture-dependent methods. The recent development of massively parallel 454 pyrosequencing [11, 12] and ion torrent sequencing [13], combined with DNA multiplexing, provides an opportunity to explore parts of the microbiome that are otherwise unreachable through culture-dependent approaches [14]. Microbiomes associated with belowground and aboveground tree habitats have been screened at a large spatial scale using these technologies in some cases, and several studies revealed the potential of the host tree genotype and environmental conditions to induce the establishment of specific microbial communities [11, 15–17]. More recently, new high-throughput technologies, such as the Illumina sequencing platform, have become available, showing a far greater sequencing capacity, producing millions of sequences, which leads to much greater depth of coverage of microbial [18]. It is now possible to examine the full extent of the richness and diversity exhibited by microorganisms in different habitats. However, the quantity of data reaches a critical point at which previous approaches are insufficient to decipher the structure



of complex microbial communities. Network analysis of significant taxon co-occurrence patterns may help to decipher the structure of complex microbial communities among various habitats. Software such as CoNet has been developed and optimized specifically to detect significant non-random patterns of co-occurrence (co-presence and mutual exclusion) using a Reboot method to determine the significance of each associations in the network [19]. Network analysis requires lot of samples replication to obtained strong statistical analysis leading to trustable correlations. This computation method combined with adapted experimental design and with the tremendous amount of metadata obtained by high throughput sequencing technologies gives us the opportunity to explore communities with a new global tool to revealed OTUs importance in the community.

Within the growing environmental pollution paradigm, poplar is a keystone tree used as feedstock for biofuel production and as a biological tool for phytoremediation and revegetation [20]. The term phytoremediation refers to the use of plants and associated microorganisms to eliminate, attenuate or restrain environmental damage or threats posed by a contaminant. Hg is a contaminant classified within the quantitatively most important pollutant groups known as trace elements (TEs). It is highly persistent in the soil environment and is classified as a “priority hazardous substance” by the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) due to its toxicity, mobility, and long residence time in the atmosphere (Available online <http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>). In a previous paper, we focused on characterizing the microbial communities that had naturally recolonized the sediment of a chlor-alkali tailings dump after sediment deposition had ceased. We further demonstrated that most of the Hg detected in the aboveground parts of Salicaceae trees collected at that site had entered the poplar leaves through exclusively through an atmospheric pathway [21]. However, the role of aboveground and belowground microbial populations in Hg-contaminated environments remains unknown, and there is a need for a holistic ecosystem-level understanding of microbial communities associated with poplar [22].

In this study, we collected soil and tree samples from the belowground and aboveground habitats of poplars grown as a short-rotation coppice (SRC) plantation at a Hg-contaminated site, and performed isolation of fungal strains. We combined fungal community analyses using Illumina-based sequencing with network analysis to investigate the composition and assembly of fungal communities in these samples. We expected that we would observe clear differences in the relative abundance and composition of fungal groups across poplar habitats that may improve our understanding of the microbial ecology of these environments. Our goal was to provide key information on the fungal communities of belowground and aboveground that

hopefully may be of use for practitioners of bioremediation approaches who often lack of important information such as the effect of the pollutants (in this case heavy Hg) on the microbial communities that surround the flora and fauna. This knowledge may benefit efforts to mitigate the environmental impact of tailing management facilities.

## **Materials and Methods**

### ***Site description and sampling design***

The location and history of the site have been fully described elsewhere [13, 23] briefly, the site investigated in the current study was exploited as a sediment storage area from the 1950s to 2003. The sediments originated from effluents produced during electrolytic processes associated with a Hg cell chlor-alkali process. A poplar monoclonal plantation of the cultivar Skado (*P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*) was implemented in 2011 as a short-rotation coppice (SRC, 2200 stems/ha). The experimental design thus guaranteed minimum host variation to focus on interactions between microorganisms in various tree habitats. Sampling was carried out in summer 2014, consisting of collecting soil, root, stem and leaf samples from six random trees, selected in three replicated plots (2 trees per plot). Soil samples composed of bulk soils from under the canopy of the trees were sieved to <4 mm. After the removal of litter, the roots were collected from the upper 20 cm layer of soil from under the canopy of the trees. They were separated from the soil via 2 ultra-pure water baths, and the smallest roots were selected and separated from larger roots by cutting them with a scalpel. Branch samples were collected from poplar branches of axe 2 (0.8 to 1.2 cm diameter) at an ca. 5 m height, corresponding to the half-crown of the poplar. Leaf samples were composed of 3 leaves collected from the above branches. All samples were obtained over a one-day period to reduce any heterogeneity imparted by climatic conditions. The samples were either freeze-dried and stored at -20 °C for molecular analysis or dried at ambient temperature (24 °C ± 1) for physico-chemical analyses. Thus, we considered the belowground and aboveground habitats to include both endophytic and epiphytic fungi.

### ***Molecular methods***

Within 2 weeks after sampling, the stored samples were freeze-dried (RP2V, Group S.G.D. France) and ground into a homogenous powder in a Mixer Mill for 3 min at 30 Hz (model MM400; Retsch Inc., Newtown, Pennsylvania, USA). Environmental DNAs were then extracted using a modified hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) chloroform/isoamyl alcohol protocol [24, 25] for root, stem and leaf samples, while

environmental DNA from the soil samples was extracted with the PowerSoil DNA isolation Kit following the manufacturer's instructions (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA USA). A purification step was added to all samples using the Power Clean® Pro DNA Clean-Up kit (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA USA) to improve the quality of the isolated DNA. DNA quality and quantity were assessed via agarose gel electrophoresis and with the QuantiT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using an FLX-Xenius spectrofluorometer (SAFAS, Monaco). Equimolar DNA pools were produced and adjusted to 10 ng/μl. Sequencing of the fungal ITS1 region [17, 26] was performed with the Illumina MiSeq platform (Microsynth AG, Switzerland). PCR amplification of the partial ITS gene was performed using the fungi-specific primers ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) and ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) [27]. These primers target a short portion of the fungal ITS region, resulting in an amplicon of small size (~ 300 bp) appropriate for Illumina sequencing.

### ***Bioinformatics and statistical analysis of diversity***

Sequence de-multiplexing and bioinformatics processing of the datasets were performed using the PIPITS pipeline [28]. PIPITS is an automated bioinformatics pipeline dedicated for fungal ITS sequences which incorporates ITSx to extract subregions of ITS and exploits the latest RDP Classifier to classify sequences against the curated UNITE fungal data set. Briefly, all raw read pairs were joined at the overlapping region and then quality filtered, chimera filtered, singleton filtered, contaminant filtered, merged and clustered into operational taxonomic units (OTUs), defined at 97% sequence similarity. We excluded singleton OTUs to avoid technical artifacts and overestimation of the number of species [29, 30]. The taxonomic assignment of OTUs was performed using the UNITE [31] database at a 97% similarity threshold. The samples were rarefied to 26 671 sequences. The Shapiro test and the Bartlett test were employed to check the normality and homoscedasticity of the data, respectively. Our data were systematically verified for non-normality and homoscedasticity, and the effects of the compartment on the alpha diversity estimates for the fungal assemblage were examined using the Kruskal-Wallis test. A number of alpha diversity indices (OTU richness, Chao estimation, Shannon diversity index, inverse of the Simpson diversity index, measure of evenness based on the Shannon index and coverage) were calculated using MOTHUR [32]. The coverage calculator returns Good's coverage for an OTU definition. Coverage was calculated as:  $C = [1 - (n/N)] * 100$  (%), where n is the number of OTUs, and N is the number of sequences.

A 2-dimensional non-metric multi-dimensional scaling (NMDS) was calculated using the Bray–Curtis method ( $k=3$ ) on the basis of standardized (Wisconsin double) and square root transformation of OTU abundance using the “metaMDS” function in the Vegan package in R. We performed a single multivariate PERMutational ANalysis Of the VAriance (PERMANOVA), run with 1,000 permutations, using the “anosim” function in the Vegan package in R and employed ANalysis Of SIMilarities (ANOSIM) to obtain P-values (i.e., significance levels) and the R value (i.e., the strength of the factors on the samples). These results were paired with a heatmap of Spearman's correlations between the relative abundances created with “heatmap.2” from the gplots package. The numbers of OTUs that were shared between habitats were visualized using Venn diagrams implemented in Mothur with the function “venn”. We considered an OTU to be present in a compartment if that OTU was present in at least 25% of the samples from the habitats. Correlations between the diversity parameters and the measured Hg parameters were calculated based on Spearman's product moment correlation coefficient ( $R^2$ ). Riverplots were created with the “riverplot” function in the riverplot R package. Rarefaction curves were generated with the “rarecurve” function of the Vegan package in R. The bioinformatic analysis was conducted using a computer with the following specifications: Ubuntu, Intel®Core™i7-4790 CPU @ 3.60GHz x8, 16GB RAM.

### ***Network analysis***

To construct a network and simplify visualization and interpretation, a separate OTU abundance table was derived using the aforementioned pipeline, but with a different OTU clustering threshold (90%) [33]. Following Weiss and collaborators [34] extremely rare OTUs were filtered out; i.e., for each habitat, all OTUs appearing in less than 25% of samples were discarded, and all OTUs showing a relative abundance of  $< 0.01\%$  of the total sequences were also discarded. Network construction was performed with the plugin CoNet (v. 1.1.b) [35] in Cytoscape software (v. 3.3.0) [36] following the protocol described by Faust and collaborators [37]. Briefly, for each of the four similarity measures (Bray–Curtis and Kullback–Leibler dissimilarity, Pearson and Spearman correlation), the distribution of all pair-wise scores was computed. Given these distributions, initial thresholds were selected such that each measure contributed 1,000 positive and 1,000 negative edges to the initial network. For each measure and each edge, 1,000 renormalized permutation and bootstrap scores were computed, followed by the measure-specific P-value. Any edges exhibiting scores outside the 95% confidence interval defined by the bootstrap distribution or that were not supported by all measures were discarded as well [34]. The networks were explored and visualized with Cytoscape. Based on

the results of Berry and Widder (2014)[38], we have chosen to use the degree as a keystone proxy.

### ***Hg analysis in the substrate and biomass***

Hg was measured in the soil and poplar samples with an AMA-254 cold vapor atomic absorption (CV-AAS) Hg analyzer (Altec Co., Czech Republic), using the standard conditions recommended by the manufacturer (120 s drying, 150 s heating, 45 s cooling). The validity of the analytical method was checked using the certified reference material (CRM) Oriental

Basma Tobacco Leaves (INCT-OBTL-5), with a certified Hg content of  $20.9 \pm 1.3$  ng/g DM [39], and quality controls were regularly performed as described elsewhere [23].

### ***Hg resistant yeast isolation and Hg resistance***

Leaves were collected from the field experimental site described above during summer 2015 and 2016, and immediately brought to the laboratory. The yeasts were isolated using an enrichment technique on a malt extract medium adapted from a previously described method [40]. Briefly, intact leaves were incubated for 48 hr at 25 °C and 200 rpm in an enrichment medium (at pH 3.7 adjusted with lactic acid) containing 30 g/l malt, 5 g/l peptone, 5 ml/l filtered leaf extract, and increasing amounts of HgCl<sub>2</sub> at final concentrations of 0, 2, 5, 10 or 20 μM. Hundred μl of leaf samples were then plated on malt extract agar (12 g/l malt) and PDA (Potato Dextrose Agar, sigma) media, supplemented with the corresponding HgCl<sub>2</sub> concentrations. The number of growing yeast was expressed in colony forming units (CFU) per ml. The strains growing at 10 μM Hg were purified, and resuspended in liquid malt extract or PDA media supplemented with 35% v/v glycerol and maintained at -80 °C for further analysis.

Isolated strains were grown in 8 ml of growth medium for 48h at 27 °C on a shaker table (200 rpm). After centrifugation, DNA was extracted from the pellet with the EZNA Bacterial DNA kit (OMEGA bio-tek, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The D1/D2 domain of LSU rRNA was amplified using a PCR with the universal primers ITS-1 (59-TCCGTAGGTGAACCTGCG-39) and NL-4 (59-GGTCCGTGTTTCAAGACGG- 39) [41]. All the ITS PCR products were sequenced by pyrosequencing 454 (Genewiz Beckman Coulter Genomics, United Kingdom). DNA sequences were edited with BioEdit software and screened against the GenBank database using BLASTn tool of the NCBI site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Minimal inhibitory concentrations (MIC) for Hg were determined for each isolated strains. Microtitration plates (96 wells) were prepared using two-fold dilutions of Hg in YPD

liquid medium, from a starting concentration of 256  $\mu\text{M}$  down to 0  $\mu\text{M}$ . Growth was measured by spectrophotometry at DO595 after 24h and 48h of incubation at 25 °C.

## Results

### *Illumina MiSeq sequencing revealed high diversity of the leaf microbiome*

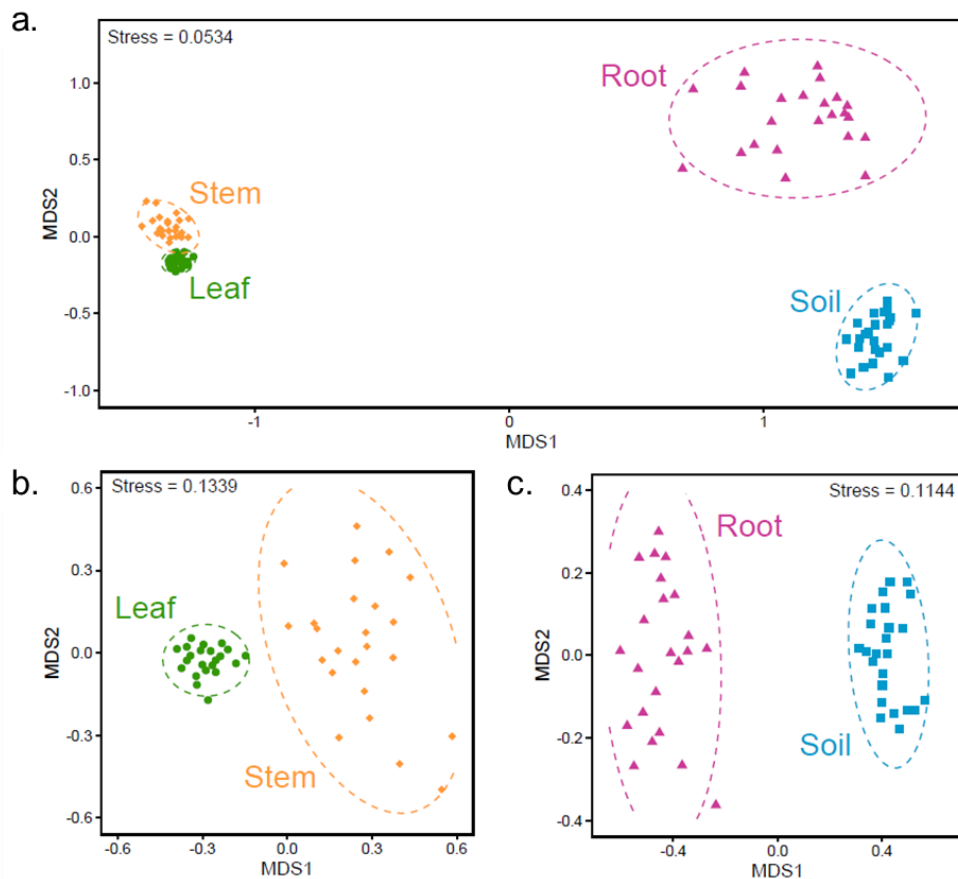
Following total genomic DNA extraction from soil and poplar samples, amplicons of the ITS1 region were generated, and a total of 8,345,173 paired-end reads were obtained through Illumina MiSeq sequencing (Table S1). Among the 24 samples from each habitat, those exhibiting a low sequence count were eliminated from the rest of the analysis. Thus, a total of 7,519,254 filtered and non-chimeric fungal sequences constituted our final processed dataset, representing 90% of the initial post-sequencing reads, spread among 6,100 non-singleton OTUs defined by representative DNA sequences with sizes of 101 to 363 bp (mean = 181.9 bp). After subsampling, our dataset contained 26,672 reads per sample, distributed in 5,565 non-singletons OTUs.

Rarefaction curve analysis, which assesses OTUs richness as a result of sampling, showed that all samples approached an asymptote, revealing that the overall fungal diversity was well represented (Fig. S1). Moreover, the measured Good's coverage values (an estimator of completeness of sampling) were greater than 99% for each sample type (Table S1) and in every sample, highlighting good overall sampling. Coverage, richness, and diversity, estimates were calculated for each dataset (Table 1). The Chao1 estimator of Mothur, indicated good sample OTUs richness throughout. The Shannon and Simpson diversity indices, measurements of overall diversity, indicated a diverse microbiota. More specifically, the diversity and richness estimates were always significantly higher in the soil samples, followed by the leaf, stem and root samples (Table 1). A permutation test confirmed that the habitat explained most of the variance in the fungal community ( $R^2 = 0.58$ ), whereas variations between plots were negligible and not statistically significant (Table S2).

**Table 1:** Richness and diversity indices of the fungal communities from the four poplar habitats. All diversity statistics were calculated using an OTU threshold of  $\geq 97\%$  sequence similarity on randomly subsampled data at the lower sample size (26,671 reads). Richness was calculated using the number of OTUs and Chao1 estimators. Diversity was estimated from the Shannon-Wiener (H), Inverse Simpson's (1/D) and Shannon Index Evenness (E) indices. Mean values and standard deviations (mean  $\pm$  SD) are provided for the leaf (n = 22), root (n = 23), and soil and stem (n = 24) samples. Values designated with the same letters were not significantly different (Kruskal-Wallis test,  $P < 0.05$ ).

Habitat	Soil	Root	Stem	Leaf
Mean number of sequences per sample	86,849	88,863	76,863	71,281
Subsample size	26,671	26,671	26,671	26,671
Observed OTUs	785 <sup>a</sup> (± 11)	373 <sup>d</sup> (± 11)	534 <sup>c</sup> (±13)	692 <sup>b</sup> (±17)
Chao estimation	1014 <sup>a</sup> (± 12)	588 <sup>d</sup> (± 16)	709 <sup>c</sup> (± 19)	949 <sup>b</sup> (± 25)
Shannon Index (H)	4.41 <sup>a</sup> (± 0.05)	3.12 <sup>d</sup> (± 0.09)	3.79 <sup>c</sup> (± 0.06)	4.09 <sup>b</sup> (± 0.04)
Inverse Simpson index (1/D)	29.7 <sup>a</sup> (± 2.5)	11.6 <sup>c</sup> (± 1.3)	19.3 <sup>b</sup> (± 1.2)	25.0 <sup>a</sup> (± 1.2)
Shannon Index Evenness (E)	0.661 <sup>a</sup> (± 0.008)	0.527 <sup>d</sup> (± 0.015)	0.604 <sup>c</sup> (± 0.007)	0.626 <sup>b</sup> (± 0.004)

The importance of the habitat factor was further corroborated through visualization in a NMDS plot (Fig. 1), and significant dissimilarity between all habitats was confirmed with the ANOSIM test (Table S3).

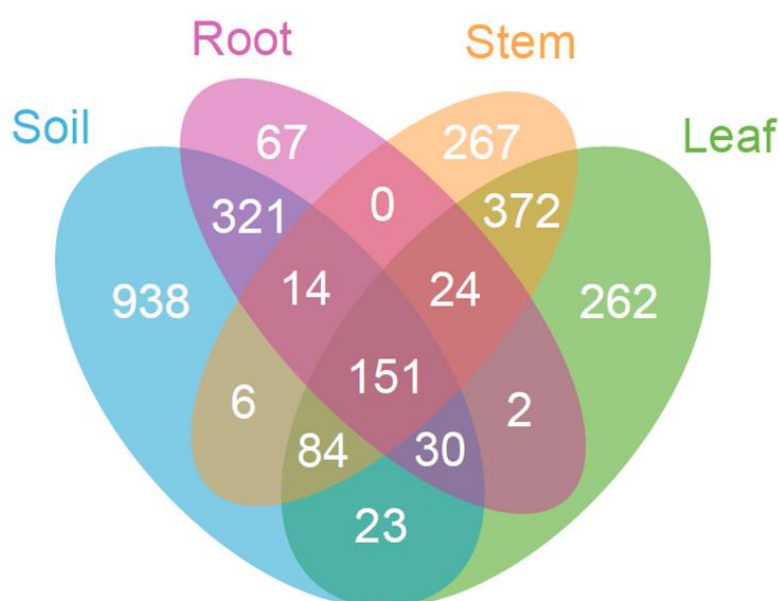


**Figure 1:** Non-parametric multidimensional scaling (NMDS) plot of fungal communities associated with the four poplar habitats, using the Bray-Curtis dissimilarity measure. Each point represents the fungal community of a given sample. Each color represents one of the 6 trees sampled. Confidence area of ellipses = 0.95, (a.): All habitats, (b.): belowground habitats, and (c.): aboveground habitats.

The Bray-Curtis method indicated that the belowground and aboveground communities at the Tavaux site were well separated (Fig. 1a). Considering the global analysis, NMDS plots revealed that root samples exhibited the greatest between-sample variation (Fig. 1a).

Furthermore, we showed that stem and leaf samples clustered closely together (Fig. 1a), although the NMDS plot of the belowground (Fig. 1b) or aboveground (Fig. 1c) communities alone showed a net clustering of each sample type in these two communities. The leaf data presented less scattering than the stem data (see sizes of ellipses in Fig. 1c). Overall, these data indicated higher homogeneity of the OTUs distribution in aboveground samples, while the soil and root samples were less homogeneous.

In the Venn diagram analysis, the sums of the total observed fungal OTUs in the four sampled habitats of the Skado plots were 1567, 609, 918 and 948 for the soil, root, stem and leaf samples, respectively (Fig. 2). Overall, 151 OTUs (5.9%) were shared by all habitats. The OTUs that were unique represented 52% and 35% of the belowground and aboveground samples, respectively (Fig. 2). The soil samples exhibited the highest proportion of unique OTUs (36.6%), followed by the leaf (10.2%) and stem (10.4%) samples. Conversely, the root samples shared > 97% of OTUs with another habitat, mostly with the soil habitat (>84.7% of the root OTUs were detected in soil samples). Our data also revealed that in the poplar phyllosphere, 51% of OTUs were shared by the stem and leaf samples, whereas 31% of OTUs were shared by the soil and root samples.

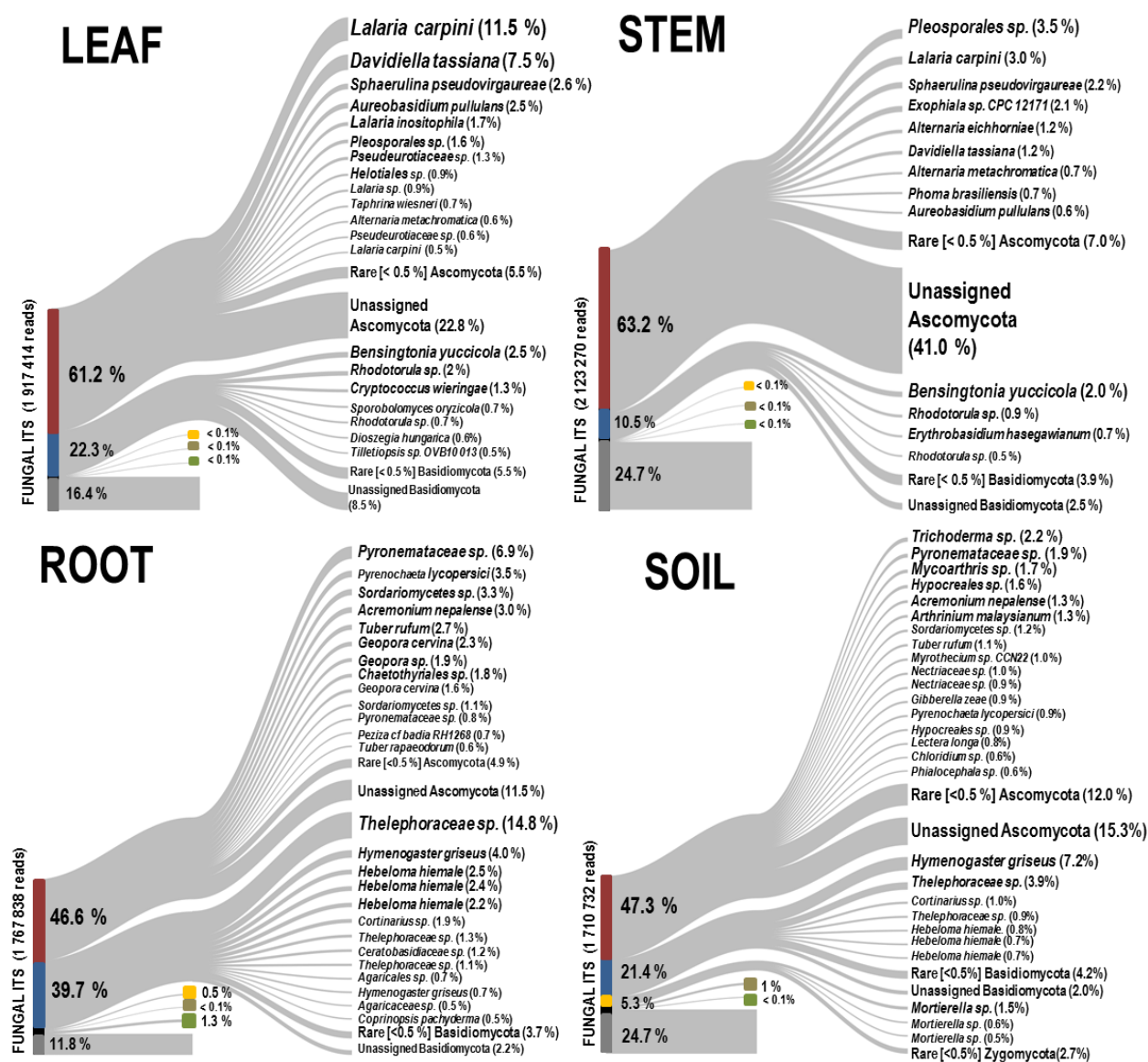


**Figure 2:** Venn diagram showing the overlap of the fungal communities from the four poplar habitats, based on OTUs. OTU delineation was based on a threshold of < 97% sequence similarity.

***Symbiotic fungi dominated the belowground habitats, whereas yeast-like fungi dominated the aboveground habitats***



The fungal communities across all four habitats were dominated by the phylum *Ascomycota* (54.6% of total relative abundance on average), while *Basidiomycota* represented a smaller portion of the communities (23.5%) (Fig. 3).

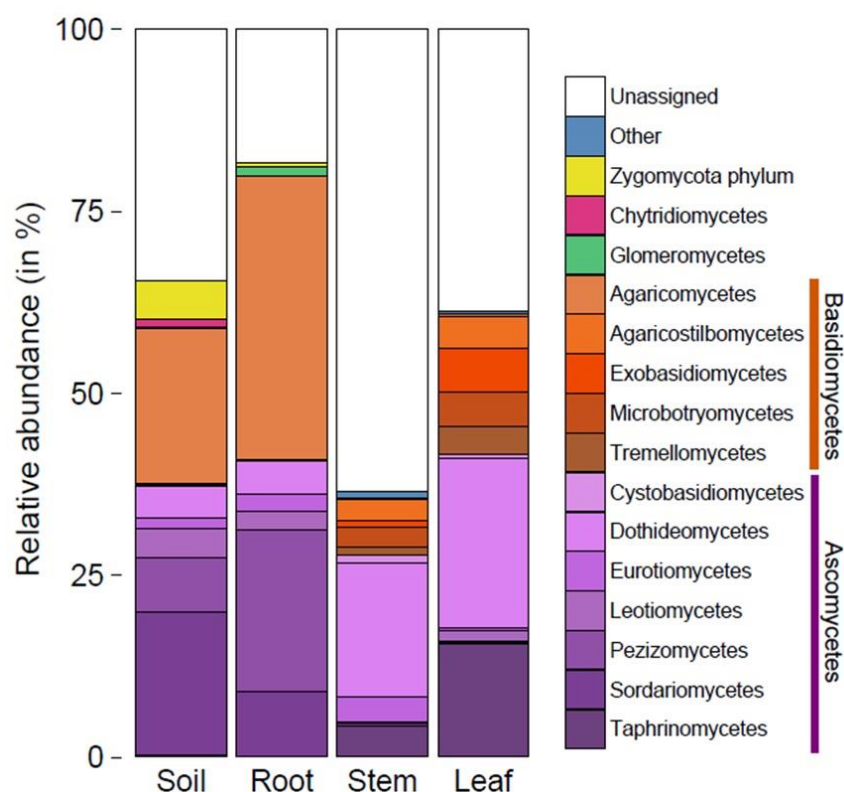


**Figure 3:** Proportion and taxonomic assignment of abundant and rare (< 0.5% relative abundance) operational taxonomic units (OTUs) from the various poplar habitats. The assignments are given at the lowest taxonomic level possible, with relative proportions presented in parentheses. The abundance of the major phyla and the total number of reads are provided on the left side of each graph, color coded as follows: Ascomycota (red), Basidiomycota (blue), Zygomycota (yellow), Chytridiomycota (brown), Glomeromycota (green) and unassigned fungi (grey).

However, the *Ascomycota/Basidiomycota* ratios were significantly higher in the aboveground samples than the belowground samples (Kruskal-Wallis  $X^2 = 36.7$ ;  $P < 1.4 \times 10^{-9}$ ). The largest proportion of Basidiomycota was found in the root samples (Kruskal-Wallis  $X^2 = 56.1$ ;  $P < 4.0 \times 10^{-12}$ ). These ratios are very similar to those identified with 454 sequencing technology in fungal communities associated with broadleaf trees [42]. Few members of the

known arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) phylum *Glomeromycota* were detected in the soil (0.25%, 92 OTUs from the *Entrophospora* and *Rhizophagus* genera) and root (1.30%, 90 OTUs from the *Entrophospora* and *Rhizophagus* genera) samples collected under poplars. OTUs assigned to mycorrhizal species were virtually absent from all aboveground samples. Members of the *Zygomycota* phylum were almost exclusively found in soil samples (5.2%, for 65 OTUs), mostly associated to *Mortierella* species.

Across all samples, we detected a total of 21 distinct fungal classes, which were unequally distributed, suggesting substantial differences between sampled habitats (Fig. 4).

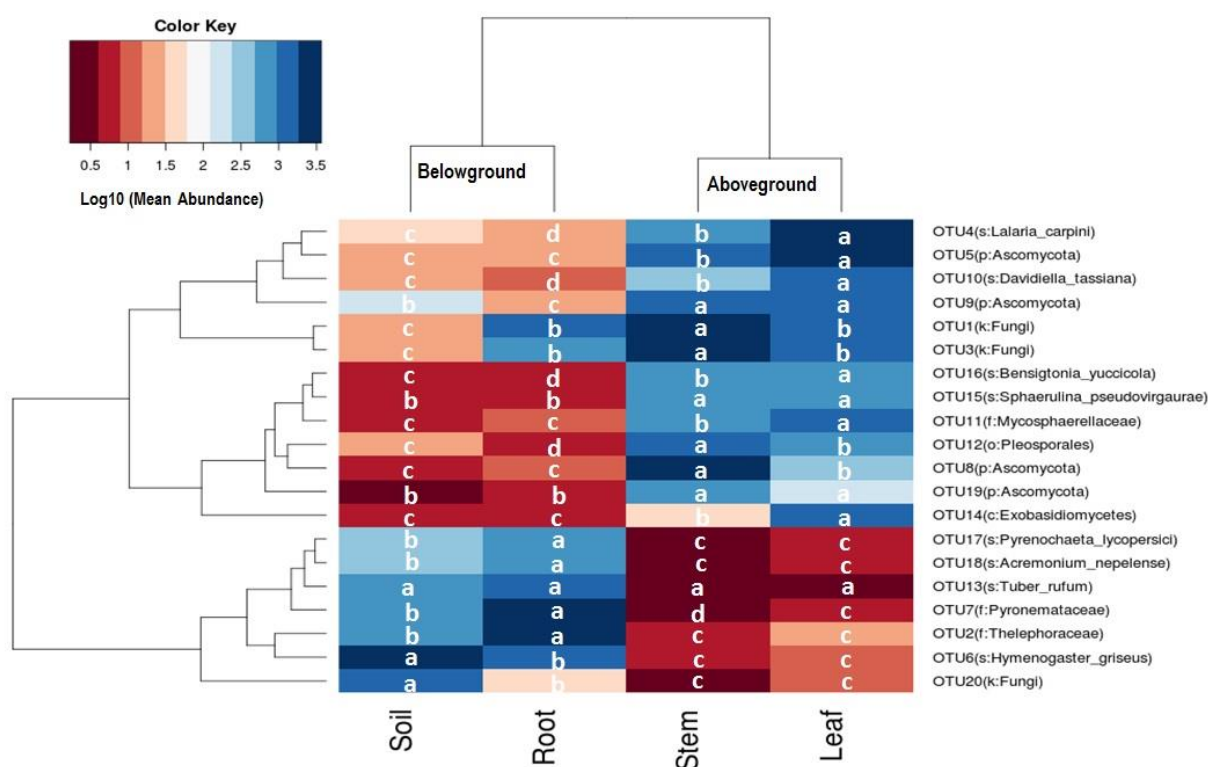


**Figure 4:** Proportion and taxonomic assignment of abundant and rare (< 0.5% relative abundance) operational taxonomic units (OTUs) from the various poplar habitats. The assignments are given at the lowest taxonomic level possible, with relative proportions presented in parentheses. The abundance of the major phyla and the total number of reads are provided on the left side of each graph, color coded as follows: *Ascomycota* (red), *Basidiomycota* (blue), *Zygomycota* (yellow), *Chytridiomycota* (brown), *Glomeromycota* (green) and unassigned fungi (grey).

The belowground habitats were enriched with *Agaricomycetes* (Kruskal-Wallis  $X^2=69.8$ ;  $P < 2.2 \times 10^{-16}$ ), *Pezizomycetes* (Kruskal-Wallis  $X^2=69.5$ ;  $P < 2.2 \times 10^{-16}$ ) and *Sordariomycetes* (Kruskal-Wallis  $X^2=67.9$ ;  $P < 2.2 \times 10^{-16}$ ). Moreover, the root samples contained significantly more *Agaricomycetes* (Kruskal-Wallis  $X^2=16.3$ ;  $P < 5.4 \times 10^{-5}$ ), *Pezizomycetes* (Kruskal-Wallis  $X^2=25.4$ ;  $P < 4.6 \times 10^{-7}$ ) and *Glomeromycetes* (Kruskal-Wallis  $X^2=17.6$ ;  $P < 2.8 \times 10^{-5}$ ) but significantly less *Sordariomycetes* and *Zygomycetes* than the soil samples. The aboveground habitats were enriched in *Dothideomycetes* (Kruskal-Wallis

X<sup>2</sup>= 65.7; P < 5.4 × 10<sup>-16</sup>) and *Taphrinomycetes* (Kruskal-Wallis X<sup>2</sup>= 69.8; P < 2.2 × 10<sup>-16</sup>) from the *Ascomycota* phylum. While some *Dothideomycetes* members were detected in root and soil samples, *Taphrinomycetes* were virtually absent from all belowground samples. Although stem and leaf sample habitats contained members of *Basidiomycota* classes, belonging to *Agaricostillbomycetes* (Kruskal-Wallis X<sup>2</sup>= 69.8; P < 2.2 × 10<sup>-16</sup>), *Exobasidiomycetes* (Kruskal-Wallis X<sup>2</sup>= 69.8; P < 2.2 × 10<sup>-16</sup>), *Microbotryomycetes* (Kruskal-Wallis X<sup>2</sup>= 69.7; P < 2.2 × 10<sup>-16</sup>) and *Tremellomycetes* (Kruskal-Wallis X<sup>2</sup>= 69.0; P < 2.2 × 10<sup>-16</sup>), these classes were virtually absent from all belowground samples. The high proportion of classes of unassigned fungi in the stem habitat (63.5%) highlights the need for additional investigations of the diversity of the fungi living in this particular habitat.

The assignment tools revealed that root and soil habitats were dominated by OTUs identified as *Hymenogaster griseus*, *Thelephoraceae* and *Hebeloma hiemale*, all of which belong to *Agaricomycetes* from the *Basidiomycota* phylum (Figs. 3 and 5).

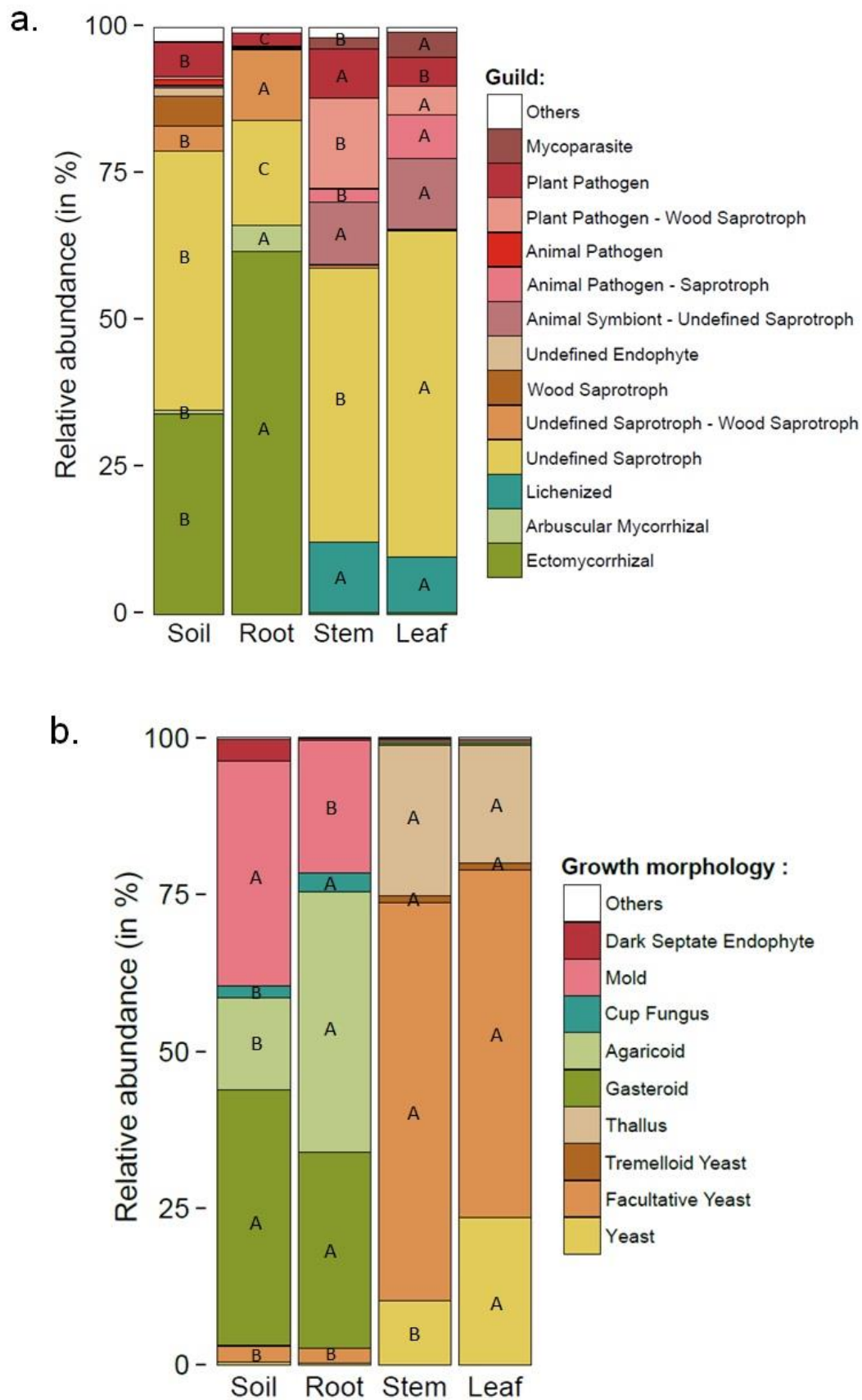


**Figure 5:** Heat map and hierarchical cluster analysis of the relative abundance of fungal OTUs from the various poplar habitats. Letters indicate significantly different abundances at p < 0.05 (Kruskal-Wallis comparison test), n=23 (root and leaf) or n=24 (soil and stem). The dendrogram represents linkage clustering using Euclidean distance measures. OTU delineation was based on a threshold of < 97% sequence similarity. The number associated with the OTU corresponds to the relative abundance rank of that OTU in the total dataset. Assignments between brackets show the lowest taxonomic level associated with the OTU using the UNITE database, k: kingdom, p: phylum, o: order, c: class, f: family, s: genus\_species.

However, *Hebeloma* (Kruskal-Wallis X<sup>2</sup>= 8.7; P < × 10<sup>-100.003</sup>) and *Thelephoraceae* (Kruskal-Wallis X<sup>2</sup>= 48.5; P < 1.7 × 10<sup>-10</sup>) OTUs dominated the root samples (Figs. 3 and 5),

whereas *Hymenogaster* OTUs (Kruskal-Wallis  $X^2= 4.3$ ;  $P < 0.04-10$ ) were the most abundant in soil samples (Fig. 3 and Fig. 5). By contrast, the aboveground samples were dominated by Ascomycota OTUs, mostly belonging to 9 genera (*Alternaria*, *Aureobasidium*, *Bensigtonia*, *Lalaria*, *Davidiella*, *Sphaerulina*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Taphrina*). The *Lalaria* (Kruskal-Wallis  $X^2= 29$ ;  $P < 1.7 \times 10^{-8}$ ) and *Davidiella* (Kruskal-Wallis  $X^2= 33$ ;  $P < 9.2 \times 10^{-9}$ ) genera were most abundantly found in leaves while a *Pleosporale* OTU was the most abundant in stems (Kruskal-Wallis  $X^2=3.5$ ;  $P < 0.05$ ) (Fig. 3). The *Basidiomycota* OTUs in aboveground samples were mostly assigned to the species *Bensigtonia yuccicola* (Figs. 3 and 5).

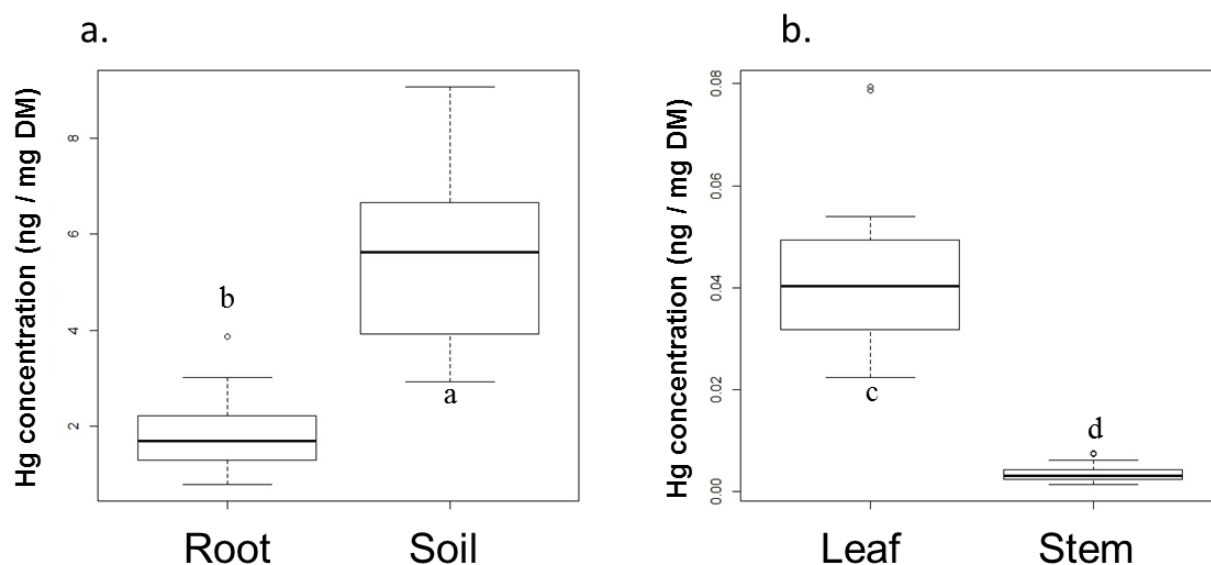
Each fungal OTU was further assigned to functional or morphological groups of fungi using FUNguild (<http://www.stbates.org/guilds/app.php>) [43] (Fig. 6). For each assignment, the FUNguild tool provides a confidence ranking, while referring to previously peer reviewed data (Table S4). To examine the distribution of OTUs within the functional categories, the abundance of the various OTU groups was set to 100%, and the OTUs were classified into guilds (Fig. 6a) and morphological categories (Fig. 6b). The investigation of trophic status in the belowground habitats revealed dominance of symbiotrophs in the root habitat (70.5%), while the soil community was composed of saprotrophs (45%), symbiotrophs (40%) and biotrophs (14%). In the aboveground habitats, saprotrophic fungi appeared to be dominant (stem, 53%; leaf, 65%) (Fig. 6a). The symbiotrophic fungi identified in the aboveground habitats belong mostly to the lichenized genus *Sphaerulina*, whereas symbiotrophs from the belowground habitats were identified as ectomycorrhizal fungi from the *Hymenogaster* genus. Another dichotomy was clearly revealed between the belowground and aboveground habitats through the analysis of growth form morphology (Fig. 6b). Indeed, as the soil and root habitats were dominated by *gasteroid* (soil: 67%; root: 48%) and *agaricoid* (soil: 21%; root: 45%) fungi, the fungal communities from the stem and leaf habitats were essentially dominated by yeasts (stem: 4%; leaf: 11%), dimorphic yeasts (stem: 62%; leaf: 38%), thallus fungi (stem: 27%; leaf: 1%) or rot fungi (stem: 11%; leaf: 37%). The presence of basidiomycetous or ascomycetous yeast in the phyllosphere has previously been observed in plants from temperate, tropical and Mediterranean climates [44, 45], in agreement with our results.



**Figure 6:** Relative proportions of fungal sequences from the various poplar habitats assigned to major fungal guilds (a) and morphological groups (b).

**Interactions with Hg**

The analysis of Hg in the various matrices revealed that the belowground habitats contained 100 times more Hg compared with the aboveground habitats (Fig. 7).



**Figure 7:** Box plots of the Hg concentration (ng/mg DM) in (a) belowground habitats, and (b) aboveground habitats. Letters indicate significant differences between habitats (p-value < 0.05).

In detail, the average values of Hg were 42.5 ng g<sup>-1</sup> DM in poplar leaves and 3.6 ng g<sup>-1</sup> DM in poplar stems, which are within the range of previously published data [21]. The root samples exhibited Hg concentrations of approximately 2.4 µg/g of DM. The soils exhibited an average Hg concentration of 5.6 µg g<sup>-1</sup> DM, in agreement with our previous data [13], but ranged from 2.92 to 9.08 µg g<sup>-1</sup> DM within the various harvested soil samples. Given the large variations in Hg concentrations in each habitat, we analyzed the correlations with Hg concentrations in the various matrices and found that only soil samples showed significant correlations between the Hg concentration and the diversity or richness indices. Specifically, we found a significant negative correlation between the soil Hg content and fungal richness indices (Observed richness: Spearman correlation coefficient of  $r^2 = -0.68$  and  $p < 0.001$ ; Chao1 index: Spearman correlation coefficient of  $r^2 = -0.42$ , and  $p < 0.05$ ). The abundance of the two fungal classes, Eurotiomycetes ( $r^2 = 0.63$ , and  $p < 0.001$ ) and Sordariomycetes ( $r^2 = 0.41$ ,  $p < 0.05$ ), were correlated with soil Hg concentrations, as well as the abundance of the two following OTUs, corresponding to a Thelephoraceae ( $r^2 = 0.44$ , and  $p < 0.05$ ) and a Trichoderma ( $r^2 = 0.48$ , and  $p < 0.05$ ) species. Conversely, the abundance of an OTU identified as Hymenogaster griseus was significantly negatively correlated with Hg ( $r^2 = -0.46$ , and  $p <$

0.05). None of the diversity, richness or abundance indices were significantly correlated in root, leaf or stem with the Hg concentrations (data not shown).

The number of yeast cells isolated from the phyllosphere was  $2.5 \cdot 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup> without Hg but decreased to  $1.9 \cdot 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup>,  $1.2 \cdot 10^6$  UFC ml<sup>-1</sup>,  $1 \cdot 10^6$  UFC ml<sup>-1</sup> and  $2 \cdot 10^5$  UFC ml<sup>-1</sup> on media enriched with 2, 5, 10 or 20 µM of HgCl<sub>2</sub>, respectively. At 10 µM HgCl<sub>2</sub>, only 2 species were isolated, namely *Nakazawaea populi* formerly known as *Candida populi*, and *Aureobasidium pullulans*, which was one of the most abundant OTU (2.5 % of detected sequences) of the metabarcoding dataset obtained from the leaf habitat. The MIC values for Hg of the isolated strains were 32 µM for *Nakazawaea populi* and 16 µM for *Aureobasidium pullulans* (Table 2).

**Table 2:** Mercury tolerance of fungi isolated from the leaves of poplar tree, expressed by their minimum inhibitory concentration (MIC).

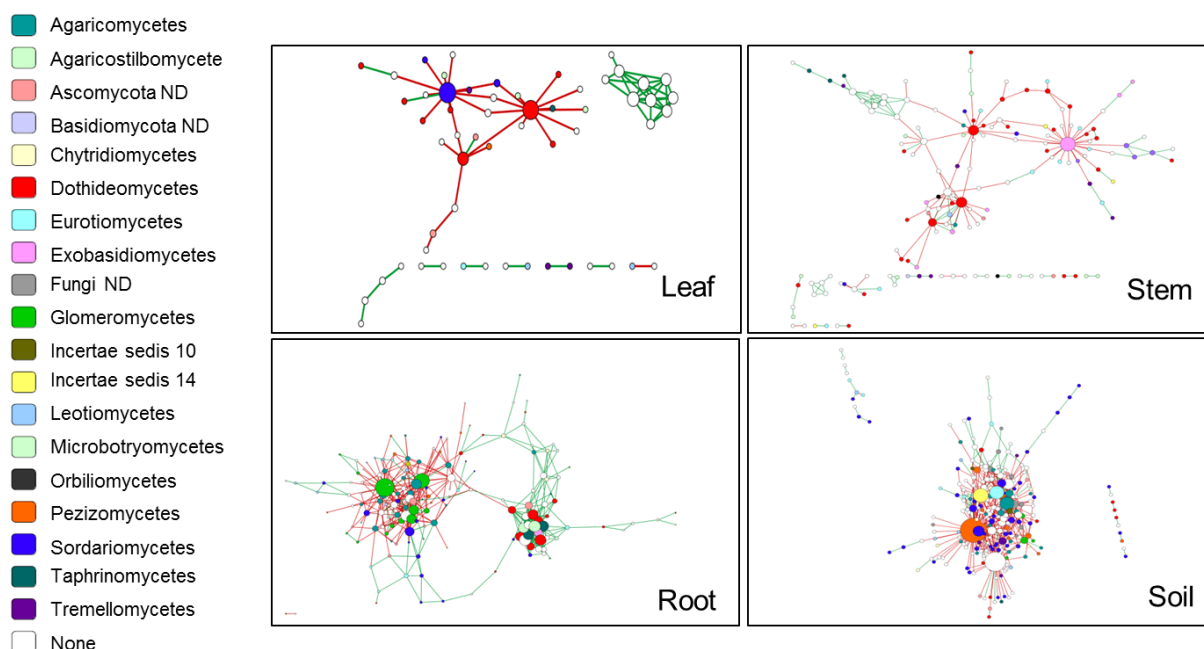
Strain code	Identification	Hg MIC 48h (µM)	Growth form morphology	Isolation medium
<i>Ascomycota Pezizomycotina</i>				
Y93	<i>Aureobasidium pullulans</i> (JX462673)	16	Dimorphic	Malt
Y97	<i>Aureobasidium pullulans</i> (JX462673)	16	Dimorphic	Malt
Y98	<i>Aureobasidium pullulans</i> (JX462673)	16	Dimorphic	Malt
Y100	<i>Aureobasidium pullulans</i> (JX462673)	16	Dimorphic	Malt
<i>Ascomycota Saccharomycotina</i>				
M14	<i>Nakazawaea populi</i> (KM065946)	32	Yeast	PDA
M15	<i>Nakazawaea populi</i> (KM065946)	32	Yeast	PDA
M16	<i>Nakazawaea populi</i> (KM065946)	16	Yeast	PDA
M18	<i>Nakazawaea populi</i> (KM065946)	32	Yeast	PDA
M19	<i>Nakazawaea populi</i> (KM065946)	32	Yeast	PDA
M20	<i>Nakazawaea populi</i> (KM065946)	32	Yeast	Malt
M22	<i>Nakazawaea populi</i> (KM065946)	32	Yeast	Malt
M23	<i>Nakazawaea populi</i> (KM065946)	32	Yeast	Malt
M24	<i>Nakazawaea populi</i> (KM065946)	32	Yeast	Malt
M25	<i>Nakazawaea populi</i> (KM065946)	32	Yeast	Malt
M26	<i>Nakazawaea populi</i> (KM065946)	32	Yeast	Malt

***The co-occurrence network revealed rare fungal OTUs with a high level of interaction in the community***

We built co-occurrence networks to further assess the links within the fungal communities of the four habitats (Fig. 8 and Table 3).

**Table 3:** Mercury tolerance of fungi isolated from the leaves of poplar tree, expressed by their minimum inhibitory concentration (MIC).

Habitats	Soil	Root	Stem	Leaf
Nodes	237	165	153	57
Edges	444	479	184	69
Network diameter	7.57	8.52	8.58	4.53
Network Connectivity	3.75	5.84	2.41	2.42
Mutual exclusion (%)	80.18	46.13	53.80	44.92
Clustering coefficient	0.13	0.28	0.16	0.13
Network density	0.008	0.012	0.013	0.086
Neighborhood connectivity distribution	23.08	10.20	9.15	6.52
Shortest path length distribution	3.09	4.21	3.75	2.14



**Figure 8:** Co-occurrence network of microbial taxa detected in the four habitats via a high-throughput DNA sequencing (Illumina MiSeq). Nodes represent fungal OTUs, whereas edges represent significant positive correlations between pairs of OTUs. The node size corresponds to the number of connections, and taxa with many correlations are within densely connected areas of the network. Green edges between nodes represent co-presence, while red edges represent mutual exclusion.

After network calculations, some topological properties that are commonly used in network analysis were completed to reveal complex patterns [46]. The root and soil habitats harbored the highest network connectivity, as exemplified by the highest number of edges and nodes (Fig. 8, Table 3). The co-presence and mutual exclusion of OTUs in the whole dataset were equally well distributed in the leaf, stem and root, habitats, whereas soil showing the highest mutual exclusion percentage (Table 3). The network indices allowed us to define the 10 dominant keystone OTUs for each habitat (Table S5), which were defined as being important



to maintain the function and structure of the microbial community and were arbitrarily identified here based on the number of connections established with the rest of the network [47]. Some taxa can be less abundant but highly connected with other taxa (as shown by the number of degrees within the node). These keystone OTUs can be divided in two groups: those generating positive connections (co-presence) and those generating negative connections (mutual exclusion). Both (+ and -) groups were evident in this subset of keystone OTUs in the leaf, stem and root habitats, whereas the soil contained mostly OTUs exhibiting negative connections, as observed for the whole soil dataset. The tendency of OTUs to cluster is revealed by the clustering coefficient, which was two-fold higher for the root habitat. In the leaf habitat, OTUs from the genus *Myrothecium* and from the class *Dothideomycetes* (unassigned genus) produced the highest number of negative connections. The genus *Myrothecium*, previously detected in mulberry, has been identified as a foliar pathogen producing mycotoxins [48]. Our work revealed that OTUs from this genus found on poplar leaves had an overall negative impact on other microbes from the leaf community. In the stem habitat, an OTU from the *Exobasidiomycetes* class showed only negative connections with all other fungal OTUs. The other keystone OTUs from the stem belonged to the *Dothideomycetes* class and exhibited mostly negative connections. Similarly, in the root habitat, two keystone OTUs belonging to *Glomeromycetes* exhibited mostly negative connections with other OTUs. In contrast to the leaf and stem habitats, other keystone OTUs presented mostly positive connections, constituting a cluster highlighted in Figure 8. *Rhodotorula* and *Lalaria* OTUs from this cluster were rather rare in the root habitat but were frequently encountered in the leaf habitat (Fig. 3). The soil habitat was characterized by keystone OTUs exhibiting mostly negative connections. The *Peziza* OTU (ITS-75-68665) displayed the greatest number of connections among all keystone OTUs by far (Table S5).

## Discussion

We used the Illumina MiSeq sequencing platform to characterize fungal communities from a poplar plantation at a Hg-contaminated site. It is important to bear in mind that we were unable to distinguish between endophytes and epiphytes in each of the three plant habitats (root, stem and leaf) and instead considered the fungal communities in these habitats in their entirety. Although we did not set out to study seasonal dynamics of the belowground and aboveground fungal communities, we should bear in mind that differing seasonal patterns between belowground [49] and aboveground [50, 51] fungal taxa have been described previously. It was

concluded that the variation of foliar chemistry across growing seasons should not be considered a major driver of the observed fungal dynamics.

Rarefaction analyses and richness estimators indicate that much of the total diversity detectable with the Illumina-based sequencing was obtained. The finding of higher richness and diversity in aboveground habitats compared with the root habitat was poorly predictable, as there are considerably fewer available studies on aboveground communities, compared with belowground communities. A previous study revealed a low percentage of fungal OTUs shared by leaf and root samples in *Fagus sylvatica* trees [42], while another study showed that a majority of aboveground OTUs were also present in the belowground compartment of agave plants [3]. Our dataset unequivocally revealed that i) less than 6% of the OTUs were detected in all four habitats, and ii) the aboveground fungal communities from poplar leaves were extremely diverse, although they were represented by only a few abundant taxa and numerous rare taxa [15, 52]. Overall, our results strongly indicate that belowground habitats host fungal communities almost completely isolated from the aboveground habitats communities in terms of taxonomy, growth morphology, and relationship with trees or microbial interactions. Considering previous studies, the finding of lower richness and diversity in the root compared with the soil habitat was expected [3, 11, 53]. Clear separation of microbiomes has been reported for soil and root samples from mature poplars [54] and 2-year-old poplars [11]. In our study, we showed that 87% of the detectable OTUs of the roots habitat were also found in the soil habitat but few taxa were strongly associated to root. Thus, the root fungal communities also displayed lower homogeneity of the species distribution compared with soil communities.

We demonstrated that the fungal communities associated with *Populus* roots mostly consisted of ectomycorrhizal fungi, which are known to develop mutually beneficial interactions with their hosts. These plant-microorganism interactions in the root compartment are probably one of the factors explaining the reasonable adaptation of *Populus* skado to this particular soil. The *Thelephorales* OTUs in the root samples accounted for the main contribution to the dominance of symbiotrophs in roots, as most members of this order are known to be ectomycorrhizal and to live in symbiosis with various host plants across Northern America and Europe. *Thelephoraceae* are indeed abundant colonizers of *Salix caprea* or *Populus tremula* roots in TE-contaminated soils [55–57]. Additionally, OTUs corresponding to the *Hebeloma*, *Cortinarius* and *Geopora* genera were also detected in our root and soil samples, in agreement with previous studies [55, 56]. Members of the *Hebeloma* mycorrhizal genus (notably *H. mesophaeum*) are frequently found within unvegetated soils [55, 56] and have been shown to promote the growth of host trees in soils contaminated with metals [58]. At the family

level, both this and a previous study by our group [13] identified *Agaricomycetes* and *Pezizomycetes* as the most frequent fungal families in the belowground compartment. Similarly, five of the 6 most common genera (*Hebeloma*, *Mortierella*, *Tuber*, *Geopora* and *Cortinarius*, but not *Hymenogaster*) identified in this study were among the top five detected previously.

The analysis of growth morphology clearly resulted in clustering of the belowground and aboveground habitats. The soil and root habitats were dominated by agaricoid and gasteroid fungi, as highlighted by the presence of *Hebeloma* and *Hymenogaster* species, respectively. The fungi from stem and leaf communities were essentially identified as yeasts or facultative yeast morphotypes (Fig. 6b), as exemplified by *Lalaria* OTUs [59]. Abundance of *Lalaria* OTUs in the phyllosphere has previously been reported on the leaves of *Fagus sylvatica* [60] and in the *Quercus* phyllosphere [15]. *Davidiella tassiana*, also known as *Mycosphaerella tassiana* or *Cladosporium herbarum*, is a leaf pathogenic fungus from the *Helotiales* order that is commonly encountered in the phyllosphere of trees [61]. Attention should therefore be paid to such data, due to potential confusion that changes in fungal names may cause. The stem tissues were enriched in *Pleosporales* sp. and *Sphaerulina pseudovirgaureae* OTUs. Previous studies have shown that phyllosphere endophytic fungi can play an important role in enhancing plant health [20], acting as biocontrol agents against other plants, insects and pathogens.

Hg is known to be a toxic element, but only few studies have explored the impact of Hg on fungal communities in field trials. Müller (2001) showed that the soil fungal biomass was not affected by the Hg along a Hg gradient ranging from 7-522 mg THg/kg of soil. Over a narrow gradient in terms of the Hg concentration, only a negative correlation between arbuscular mycorrhizal fungi and Hg was observed in the literature, while no correlation was found between ectomycorrhizal (ECM) fungi and Hg [63]. Therefore, this study is the first to describe a significant negative effect of Hg on soil fungal richness and diversity under long-term, natural Hg exposure. In contrast, Hg exposure was not a major driver of the root, stem and leaf communities, probably due to the limited variations and the limited impact these variations may have on cellular processes. Nevertheless, we were able to isolate some Hg resistant yeast strains from the leaf habitat. Resistance here refer to the fact that these strains were isolated on Hg-enriched growth media, and to the MIC measured for these strains, which are comparable to previously published data [64]. As most of the Hg detected in poplar leaves entered through the atmospheric pathway [21], we indeed focused on the isolation of Hg resistant fungi from this habitat. We thus isolated *Aureobasidium pullulans* Hg resistant strains, also highly represented in the leaf metabarcoding dataset (Fig. 3). This species is recognized as an active phylloplane colonizer [65], which showed some capacity to bind metals to the cell

surfaces [66]. Other, authors previously revealed that melanized fungi such as *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* spp. and *Alternaria alternate* have been isolated from soil samples treated with toxic industrial wastes containing high concentrations of copper and mercury and may also be dominant members of the mycobiota of metal-contaminated phylloplanes [67]. We also isolated *Nakazawaea populi* Hg resistant strains, that were not detected in our metabarcoding dataset, probably due to an uncomplete assignment, and that may be part of the unassigned *Ascomycota* cluster (Fig. 3). This strain has been recently assigned to the *Nakazawaea* genus, and was previously known as a member of the *Candida* genus [68]. *C. populi* was indeed isolated from poplar sap exudate [69]. These strains will be further used in inoculation experiments, to better understand the role of leaf yeast communities on the overall Hg cycle between soil, atmospheric and leaf compartments.

This study is the first to explore the organization of the fungal communities of soil, roots, stems and leaves using a co-occurrence approach at the scale of a clonal tree stand. Indeed, previous studies have focused on species abundance and diversity, but not on the interactions among species, which could be more important to ecosystem functioning [70]. Co-occurrence networks represent individual microbes (operational taxonomic units (OTUs)) as nodes and feature–feature pairs as edges, where an edge may imply a biologically or biochemically meaningful relationship between features, and are based on correlations [34]. For instance, one may expect that mutualistic microbes, or those that benefit each other, will co-occur across samples. In contrast, antagonistic relationships between microbes, such as competition for the same niche, result in a mutual exclusion. It has been observed that phylogenetically related microbes have a tendency to positively co-occur [71]. In practice, microbes may exhibit positive or negative correlations for indirect reasons, based on their environmental preferences. The overall dataset revealed that non-abundant OTUs might play a significant role in the network of interactions. Co-occurrence network analysis of the fungal communities from the four habitats established a clear dichotomy between soil and the three other habitats, where the soil community was dominated by negative edges, known as mutual exclusion. It should be noted that sequencing depth impacts the percentage of positive edges in the network, with a low depth resulting in spurious positive correlations [37]. Thus, the large number of negative correlations found in our study can be correlated with our extremely high sequencing depth. This dominance of negative degrees found in the soil (80%), but not in the roots nor in the aboveground habitats, could reflect a high degree of competition between fungi in the soil due to a lack of nutrient availability in the absence of tree exudates. It is also possible that the soil microorganisms under the canopy were in competition with the plants for nutrients

such as nitrogen, exacerbating the nutrient competition between microorganisms [72]. The network obtained from the fungal sequencing data also revealed that the root compartment present the highest number of interactions between fungi and the highest clustering coefficient, with predominance of *Glomeromycetes*, showing a great number of interactions with other fungi. Arbuscular mycorrhizas (AM) formed by *Glomeromycetes* are widespread in living plants, supporting the ancestral origin of the plant–*Glomeromycetes* symbiosis, as fully supported by the literature [73]. We noted that the class *Glomeromycetes* produced many degrees of mutual exclusion with other classes and between the most interactive *Glomeromycetes* themselves. The hub in the root compartment network typical of the leaf compartment could correspond to the transfer of microorganisms during leaf fall in the root area, but the real explanation is still unclear.

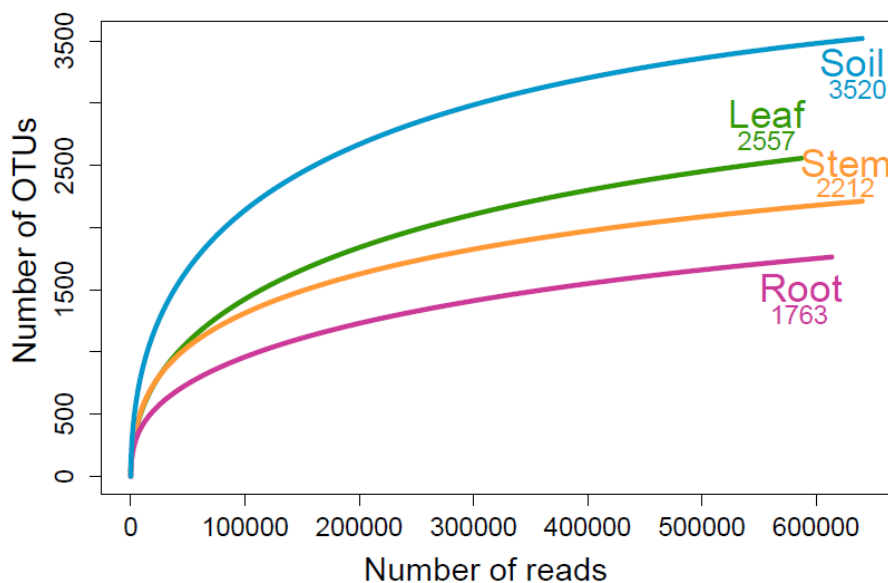
We may conclude that each habitat that we studied represents a unique niche for the fungal communities in a monoclonal plantation of the cultivar Skado (*P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*) implemented in 2011 as a short-rotation coppice (SRC, 2200 stems/ha). Aboveground and belowground poplar habitats host completely different fungal communities, as highlighted by the core microbiome of the four habitats that represent only reduced to 5.9% of the total OTUs. We will further explore the role of fungal organisms in the Hg cycle, which deserves attention. We believe that our findings will be instructive for the design of future ecological restoration practices.

## Acknowledgments

This work was supported by the French National Research Agency [ANR BIOFILTREE 2010-INTB-1703-01], the ADEME (French Environment and Energy Management Agency) [PROLIPHYT 1172C0053], the Région Franche-Comté [Environnement-Homme-Territoire 2014-069], the Pays de Montbéliard Agglomération [13/070-203-2015], and the French national program EC2CO- MicrobiEen FREIDI-Hg. A.D. received a PhD grant from the Région Franche-Comté. A.D and F.M. contributed equally to this work.

## Supporting Informations

The following Supporting Information is available for this article:



**Figure S1.** Rarefaction analysis of ITS1 region sequence data for estimating fungal diversity based on a threshold of < 97% sequence similarity for the delineation of operational taxonomic units (OTUs). Comparisons of the fungal communities from the soil, roots, stems and leaves of a *Populus skado* population cultivated under soil Hg contamination (6 ppm).

**Table S1.** Description of the datasets. Numbers under brackets are the percentage of total effective sequences. “SH”: species hypothesis.

Habitats	Number of samples	Effectives sequences	Phylum assigned sequences	Class assigned sequences	SH assigned sequences	Good' Coverage
<b>Combined dataset</b>	93	7,519,254	6,004,207 (79.9%)	4,451,219 (59.2%)	3,915,869 (52.1%)	99.4
<b>Soil</b>	24	1,710,732	1,288,295 (75.3%)	1,099,386 (64.3%)	992,229 (58.0%)	99.4
<b>Root</b>	23	1,767,838	1,558,988 (88.2%)	1,426,069 (80.7%)	1,314,033 (74.33%)	99.5
<b>Stem</b>	24	2,123,270	1,567,354 (73.8%)	752,287 (35.4%)	644,625 (30.36%)	99.4
<b>Leaf</b>	22	1,917,414	1,589,570 (82.9%)	1,173,477 (61.2%)	964,982 (50.33%)	99.1

**Table S2.** PERMANOVA analyses of the fungal communities associated with poplar considering the factors of habitats, plots and their interactions. For each F test (F), the degrees of freedom (Df), residuals, coefficient of variation ( $R^2$ ) and  $p$  value (P) are indicated.

Factor		Df	Residuals	F.Model	R2	P
Global						
	Sample type	3	88	40.655	0.581	0.001
	Tree sampled	5	86	1.200	0.065	0.207
	Sample type: Tree sampled	15	76	1.450	0.093	0.018
Below (Soil and root)						
	Sample type	1	44	14.304	0.245	0.001
	Tree sampled	5	40	1.007	0.112	0.415
	Sample type: Tree sampled	5	40	1.257	0.076	0.112
Above (Stem and leaf)						
	Sample type	1	44	32.000	0.421	0.001
	Tree sampled	5	40	0.80	0.092	0.683
	Sample type: Tree sampled	5	40	1.171	0.072	0.238

**Table S3.** ANOSIM of the fungal communities associated with the four poplar habitats and their interactions. An ANOSIM  $R^2$  value of 1 indicates complete dissimilarity between groups. Significance levels were estimated ( $p$  value < 0.05).

Compartments	$R^2$	p-value
Soil: Root: Stem: Leaf	0.86	0.001
Soil: Root: Stem	0.96	0.001
Soil: Stem: Leaf	0.84	0.001
Soil: Root: Leaf	0.96	0.001
Root: Stem: Leaf	0.79	0.001
Soil: Root	0.82	0.001
Soil: Stem	1	0.001
Soil: Leaf	1	0.001
Root: Stem	0.99	0.001
Root: Leaf	0.99	0.001
Stem: Leaf	0.85	0.001

**Table S4.** Example of FUNguild assignment table

OTU ID	sample	Growth Morphology	taxonomy	Taxon	Taxon Level	Trophic Mode	Guild	Confidence Ranking	Trait	Notes	Citation/Source
ID_exemple1	habitat A	Agaricoid	k_Fungi; p_Basidiomycota; c_Agaricomycetes; o_Agaricales; f_Tricholomataceae; g_Tricholoma; s_Tricholoma_scalpturatum SH193992,06FU	Tricholoma	13	Symbiotroph	Ectomycorrhizal	Highly Probable	NULL	NULL	Rinaldi AC, et al, 2008, Fungal Diversity 33:1-45; Tedersoo L, et al, 2010, Mycorrhiza 20:217-263; <a href="http://mycorrhizas.info/ecmf.html">http://mycorrhizas.info/ecmf.html</a>

**Table S5.** The ten keystone species in each habitat, characterized by their number of connections, shown by the number of total degrees, as either positive (+) or negative (-), and their relative abundance (%).

habitat	class	genus	OTU	degree	+	-	Abundance (%)
Leaf	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Myrothecium</i>	ITS-10-33105	13	1	12	0.013
	<i>Dothideomycetes</i>	<i>unassigned</i>	ITS-22-43074	12	0	12	0.017
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-24-223674	8	8	0	0.253
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-17-15719	7	7	0	0.469
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-24-207298	7	7	0	0.636
	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Dothideomycetes ND</i>	ITS-25-24380	7	1	6	0.015
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-14-9158	6	6	0	0.242
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-18-89496	6	6	0	0.358
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-20-53698	6	6	0	0.191
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-24-147537	6	6	0	0.115
Stem	<i>Exobasidiomycetes</i>	<i>Exobasidiomycetes ND</i>	ITS-6-10425	28	0	28	0.159
	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Pleosporales ND</i>	ITS-39-17431	18	4	14	0.011
	<i>Dothideomycetes</i>	<i>unassigned</i>	ITS-96-2475	17	1	16	0.015
	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Sclerostagonospora</i>	ITS-18-79499	12	4	8	0.016
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-28-13546	11	3	8	0.048
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-18-89496	9	9	0	0.052
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-14-9158	8	8	0	0.038
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-24-207298	8	8	0	0.091
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-33-23754	8	2	6	0.013
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-17-15719	7	7	0	0.065
Root	<i>Glomeromycetes</i>	<i>Glomeraceae ND</i>	ITS-56-66798	31	4	27	0.018
	<i>Glomeromycetes</i>	<i>Entrophospora</i>	ITS-84-41503	25	2	23	0.040
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-26-60015	19	19	0	0.080
	<i>Microbotryomycetes</i>	<i>Rhodotorula</i>	ITS-45-24611	19	19	0	0.010
	<i>Dothideomycetes</i>	<i>unassigned</i>	ITS-20-30632	18	18	0	0.039
	<i>Taphrinomycetes</i>	<i>Lalaria</i>	ITS-24-161008	18	18	0	0.015
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-70-85660	18	5	13	0.020
	<i>Taphrinomycetes</i>	<i>Lalaria</i>	ITS-19-64636	17	17	0	0.078
	<i>Dothideomycetes</i>	<i>unassigned</i>	ITS-32-60520	17	17	0	0.030
	<i>Agaricomycetes</i>	<i>Sebacinaceae ND</i>	ITS-67-12914	17	1	16	0.086
Soil	<i>Pezizomycetes</i>	<i>Peziza</i>	ITS-75-68665	63	2	61	0.313
	<i>none</i>	<i>none</i>	ITS-93-78141	48	3	45	0.106
	<i>Incertae sedis 14</i>	<i>Hymenula</i>	ITS-77-41916	32	5	27	0.025
	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Exophiala</i>	ITS-83-24561	30	1	29	0.036
	<i>Agaricomycetes</i>	<i>Ceratobasidiaceae ND</i>	ITS-80-41094	29	1	28	0.020
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-57-30026	22	1	21	0.052
	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Lasiosphaeriaceae ND</i>	ITS-96-29396	22	4	18	0.028
	<i>Fungi unidentified 1</i>	<i>Fungi ND 1.1</i>	ITS-80-44171	15	1	14	0.080
	<i>unassigned</i>	<i>unassigned</i>	ITS-89-5134	15	2	13	0.015
	<i>Sordariomycetes</i>	<i>unassigned</i>	ITS-93-46680	14	8	6	0.013



## References

1. van der Heijden MGA, Hartmann M (2016) Networking in the Plant Microbiome. *PLOS Biol* 14:e1002378. doi: 10.1371/journal.pbio.1002378
2. Leff JW, Tredici P Del, Friedman WE, Fierer N (2014) Spatial structuring of bacterial communities within individual *Ginkgo biloba* trees. *Environ Microbiol* 17:2352–2361. doi: 10.1111/1462-2920.12695
3. Coleman-Derr D, Desgarennes D, Fonseca-Garcia C, et al (2015) Biogeography and cultivation affect microbiome composition in the drought-adapted plant Subgenus *Agave*. *New Phytol* 209:798–811. doi: 10.1111/nph.13697
4. Balint M, Bartha L, O’Hara RB, et al (2015) Relocation, high-latitude warming and host genetic identity shape the foliar fungal microbiome of poplars. *Mol Ecol* 24:235–248. doi: 10.1111/mec.13018
5. Lenoir I, Fontaine J, Lounès-Hadj Sahraoui A (2016) Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry* 123:4–15. doi: 10.1016/j.phytochem.2016.01.002
6. Whipps JM, Hand P, Pink D, Bending GD (2008) Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J Appl Microbiol* 105:1744–55. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03906.x
7. Ritpitakphong U, Falquet L, Vimoltust A, et al (2016) The microbiome of the leaf surface of *Arabidopsis* protects against a fungal pathogen. *New Phytol* 210:1033–1043. doi: 10.1111/nph.13808
8. Waller F, Achatz B, Baltruschat H, et al (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13386–13391. doi: 10.1073/pnas.0504423102
9. Hartley SE, Gange AC (2009) Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Annu Rev Entomol* 54:323–42. doi: 10.1146/annurev.ento.54.110807.090614
10. Martínez-Álvarez P, Fernández-González RA, Sanz-Ros AV, et al (2016) Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease in *Pinus radiata* seedlings. *Biol Control* 94:1–10. doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.11.011
11. Danielsen L, Thürmer A, Meinicke P, et al (2012) Fungal soil communities in a young transgenic poplar plantation form a rich reservoir for fungal root communities. *Ecol Evol* 2:1935–1948. doi: 10.1002/ece3.305
12. Tedersoo L, Bahammad B, Polme S, et al (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* (80- ) 346:1256688.
13. Zappelini C, Karimi B, Foulon J, et al (2015) Diversity and complexity of microbial communities from a chlor-alkali tailings dump. *Soil Biol Biochem* 90:101–110. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.08.008
14. Yergeau E, Lawrence JR, Sanschagrin S, et al (2012) Next-generation sequencing of microbial communities in the athabasca river and its tributaries in relation to oil sands mining activities. *Appl Environ Microbiol* 78:7626–7637. doi: 10.1128/AEM.02036-12
15. Jumpponen A, Jones KL (2009) Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytol* 184:438–448. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02990.x
16. Knief C, Delmotte N, Chaffron S, et al (2012) Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME J* 6:1378–1390. doi: 10.1038/ismej.2011.192
17. Bonito G, Reynolds H, Robeson MS, et al (2014) Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Mol Ecol* 23:3356–70. doi: 10.1111/mec.12821
18. Foulon J, Zappelini C, Durand A, et al (2016) Impact of poplar-based phytomanagement on soil properties and microbial communities in a metal-contaminated site. *FEMS Microbiol Ecol* 92:fiw163. doi: 10.1093/femsec/fiw163
19. Faust K, Sathirapongsasuti JF, Izard J, et al (2012) Microbial co-occurrence relationships in the Human Microbiome. *PLoS Comput Biol* 8:e1002606. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002606
20. Xiang L, Gong S, Yang L, et al (2015) Biocontrol potential of endophytic fungi in medicinal plants from Wuhan Botanical Garden in China. *Biol Control* 94:47–55. doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.12.002
21. Assad M, Parelle J, Cazaux D, et al (2015) Mercury uptake into poplar leaves. *Chemosphere* 146:1–7.

- doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.11.103
22. Hacquard S, Schadt CW (2015) Towards a holistic understanding of the beneficial interactions across the *Populus* microbiome. *New Phytol* 205:1424–30. doi: 10.1111/nph.13133
  23. Maillard F, Girardclos O, Assad M, et al (2016) Dendrochemical assessment of mercury releases from a pond and dredged-sediment landfill impacted by a chlor-alkali plant. *Environ Res* 148:122–126. doi: 10.1016/j.envres.2016.03.034
  24. Lefort F, Douglas GC (1999) An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Ann For Sci* 56:259–263. doi: 10.1051/forest:19990308
  25. Healey A, Furtado A, Cooper T, Henry RJ (2014) Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods* 10:21. doi: 10.1186/1746-4811-10-21
  26. Huang CL, Jian FY, Huang HJ, et al (2014) Deciphering mycorrhizal fungi in cultivated *Phalaenopsis* microbiome with next-generation sequencing of multiple barcodes. *Fungal Divers* 66:77–88. doi: 10.1007/s13225-014-0281-x
  27. Smith DP, Peay KG (2014) Sequence depth, not PCR replication, improves ecological inference from next generation DNA sequencing. *PLoS One* 9:e90234. doi: 10.1371/journal.pone.0090234
  28. Gweon HS, Oliver A, Taylor J, et al (2015) PIPITS: An automated pipeline for analyses of fungal ITS sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods Ecol Evol* 6:973–980. doi: 10.1111/2041-210X.12399
  29. Dickie IA (2010) Insidious effects of sequencing errors on perceived diversity in molecular surveys. *New Phytol* 188:916–918. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03473.x
  30. Tedersoo L, May TW, Smith ME (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20:217–263. doi: 10.1007/s00572-009-0274-x
  31. Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, et al (2013) Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol Ecol* 22:5271–5277. doi: 10.1111/mec.12481
  32. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al (2009) Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09
  33. Bell TH, El-Din Hassan S, Lauron-Moreau A, et al (2014) Linkage between bacterial and fungal rhizosphere communities in hydrocarbon-contaminated soils is related to plant phylogeny. *ISME J* 8:331–43. doi: 10.1038/ismej.2013.149
  34. Weiss S, Van Treuren W, Lozupone C, et al (2016) Correlation detection strategies in microbial data sets vary widely in sensitivity and precision. *ISME J*. doi: 10.1038/ismej.2015.235
  35. Faust K, Raes J (2012) Microbial interactions: from networks to models. *Nat Rev Microbiol* 10:538–550. doi: 10.1038/nrmicro2832
  36. Christmas R, Avila-Campillo I, Bolouri H, et al (2005) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Am Assoc Cancer Res Educ B* 13:2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303.metabolite
  37. Faust K, Lima-Mendez G, Lerat JS, et al (2015) Cross-biome comparison of microbial association networks. *Front Microbiol* 6:1–13. doi: 10.3389/fmicb.2015.01200
  38. Berry D, Widder S (2014) Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks. *Front Microbiol* 5:1–14. doi: 10.3389/fmicb.2014.00219
  39. Samczyński Z, Dybczyński RS, Polkowska-Motrenko H, et al (2012) Two new reference materials based on tobacco leaves: certification for over a dozen of toxic and essential elements. *ScientificWorldJournal* 2012:216380. doi: 10.1100/2012/216380
  40. Fu S-F, Sun P-F, Lu H-Y, et al (2016) Plant Growth-Promoting Traits of Yeasts Isolated from the Phyllosphere and Rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. *Fungal Biol* 120:433–448. doi: 10.1016/j.funbio.2015.12.006

41. Sun PF, Fang WT, Shin LY, et al (2014) Indole-3-Acetic Acid-Producing Yeasts in the Phyllosphere of the Carnivorous Plant. 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0114196
42. Counce A, Cordier T, Lengellé J, et al (2014) Leaf and root-associated fungal assemblages do not follow similar elevational diversity patterns. PLoS One 9:e100668. doi: 10.1371/journal.pone.0100668
43. Nguyen NH, Song Z, Bates ST, et al (2015) FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. Fungal Ecol 20:241–248. doi: 10.1016/j.funeco.2015.06.006
44. Inacio J, Portugal L, Spencer-Martins I, Fonseca A (2005) Phylloplane yeasts from Portugal: Seven novel anamorphic species in the *Tremellales* lineage of the *Hymenomycetes* (*Basidiomycota*) producing orange-coloured colonies. FEMS Yeast Res 5:1167–1183. doi: 10.1016/j.femsyr.2005.05.007
45. Limtong S, Koowadjanakul N (2012) Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole-3-acetic acid. World J Microbiol Biotechnol 28:3323–3335. doi: 10.1007/s11274-012-1144-9
46. Barberán A, Bates ST, Casamayor EO, Fierer N (2012) Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. ISME J 6:343–351. doi: 10.1038/ismej.2011.119
47. Lupatini M, Suleiman AK a., Jacques RJS, et al (2014) Network topology reveals high connectance levels and few key microbial genera within soils. Front Environ Sci 2:1–11. doi: 10.3389/fenvs.2014.00010
48. Murakami R, Kawakita H, Shirata A (2002) Infection behaviour of conidia of *Myrothecium roridum* on mulberry leaf and cytological changes of leaf cells infected with the fungus. Séricologia 42:19–38.
49. Shakya M, Gottel N, Castro H, et al (2013) A multifactor analysis of fungal and bacterial community structure in the root microbiome of mature *Populus deltoides* trees. PLoS One 8:e76382. doi: 10.1371/journal.pone.0076382
50. Glushakova AM, Chernov IY (2004) Seasonal Dynamics in a Yeast Population on Leaves of the Common Wood Sorrel *Oxalis acetosella* L. Microbiology 73:184–188. doi: 10.1023/B:MICI.0000023987.40253.2d
51. Jumpponen A, Jones KL (2010) Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. New Phytol 186:496–513. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03197.x
52. Balint M, Tiffin P, Hallstrom B, et al (2013) Host Genotype Shapes the Foliar Fungal Microbiome of Balsam Poplar (*Populus balsamifera*). PLoS One 8:e53987. doi: 10.1371/journal.pone.0053987
53. Foulon J, Zappellini C, Durand A, et al (2016) Environmental metabarcoding reveals contrasting microbial communities at two poplar phytomanagement sites. Sci Total Environ 571:1230–1240. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.151
54. Gottel NR, Castro HF, Kerley M, et al (2011) Distinct Microbial Communities within the Endosphere and Rhizosphere of *Populus deltoides* Roots across Contrasting Soil Types. Appl Environ Microbiol 77:5934–5944. doi: 10.1128/AEM.05255-11
55. Regvar M, Likar M, Piltaver A, et al (2010) Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: the potential of screening in a model phytostabilisation study. Plant Soil 330:345–356. doi: 10.1007/s11104-009-0207-7
56. Krpata D, Peintner U, Langer I, et al (2008) Ectomycorrhizal communities associated with *Populus tremula* growing on a heavy metal contaminated site. Mycol Res 112:1069–1079. doi: 10.1016/j.mycres.2008.02.004
57. Hrynkiewicz K, Haug I, Baum C (2008) Ectomycorrhizal community structure under willows at former ore mining sites. Eur J Soil Biol 44:37–44. doi: 10.1016/j.ejsobi.2007.10.004
58. Hrynkiewicz K, Dabrowska G, Baum C, et al (2012) Interactive and Single Effects of Ectomycorrhiza Formation and *Bacillus cereus* on Metallothionein MT1 Expression and Phytoextraction of Cd and Zn by Willows. Water Air Soil Pollut 223:957–968. doi: 10.1007/s11270-011-0915-5
59. Inácio J, Rodrigues MG, Sobral P, Fonseca Á (2004) Characterisation and classification of phylloplane yeasts from Portugal related to the genus *Taphrina* and description of five novel *Lalaria* species. FEMS Yeast Res 4:541–555. doi: 10.1016/S1567-1356(03)00226-5
60. Cordier T, Stan, Robin C, et al (2012) The composition of phyllosphere fungal assemblages of European

- beech (*Fagus sylvatica*) varies significantly along an elevation gradient. *New Phytol* 196:510–519.
61. Jakuschkin B, Fievet V, Schwaller L, et al (2016) Deciphering the Pathobiome: Intra- and Interkingdom Interactions Involving the Pathogen *Erysiphe alphitoides*. *Environ Microbiol* 1–11. doi: 10.1007/s00248-016-0777-x
  62. Müller A (2001) The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiol Ecol* 36:11–19.
  63. Jean-Philippe SR, Franklin JA, Buckley DS, Hughes K (2011) The effect of mercury on trees and their mycorrhizal fungi. *Environ Pollut* 159:2733–2739. doi: 10.1016/j.envpol.2011.05.017
  64. Moller AK, Barkay T, Hansen M a., et al (2014) Mercuric reductase genes (*merA*) and mercury resistance plasmids in High Arctic snow, freshwater and sea-ice brine. *FEMS Microbiol Ecol* 87:52–63. doi: 10.1111/1574-6941.12189
  65. Andrews JH, Harris RF (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces.
  66. Gadd geoffrey M, Mowl JL (1985) Copper uptake by yeast-like cells, hyphae and chlamydo spores of *Aureobasidium pullulans*. *Exp Mycobiology* 9:230–240.
  67. Gadd GM (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res* 111:3–49. doi: 10.1016/j.mycres.2006.12.001
  68. Kurtzman CP, Robnett CJ (2014) Description of *Kuraishia piskuri* f.a., sp. nov., a new methanol assimilating yeast and transfer of phylogenetically related *Candida* species to the genera *Kuraishia* and *Nakazawaea* as new combinations. *FEMS Yeast Res* 14:1028–1036. doi: 10.1111/1567-1364.12192
  69. Hagler AN, Mendonca-Hagler LC, Phaff HJ (1989) *Candida populi*, a new species of yeast occurring in exudates of *Populus* and *Betula* species. *Int J Syst Evol Microbiol* 39:97–99. doi: 10.1099/00207713-39-2-97
  70. Lu L, Yin S, Liu X, et al (2013) Fungal networks in yield-invigorating and -debilitating soils induced by prolonged potato monoculture. *Soil Biol Biochem* 65:186–194. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.05.025
  71. Lozupone C, Faust K, Raes J, et al (2012) Identifying genomic and metabolic features that can underlie early successional and opportunistic lifestyles of human gut symbionts. *Genome Res* 22:1974–1984. doi: 10.1101/gr.138198.112
  72. Kaye JP, Hart SC (1997) Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends Ecol Evol* 12:139–143. doi: 10.1016/S0169-5347(97)01001-X
  73. Selosse MA, Strullu-Derrien C, Martin FM, et al (2015) Plants, fungi and oomycetes: A 400-million year affair that shapes the biosphere. *New Phytol* 206:501–506. doi: 10.1111/nph.13371

#### 4.2.2 Bilan et mise en perspective des travaux

Cette publication a permis une description approfondie des communautés de champignons dans les quatre habitats décrits ci-dessus et a permis de déceler une communauté particulièrement abondante dans la phyllosphère. Elle a également mis en avant l'importance de certaines OTUs au sein de la communauté non seulement du fait de leur abondance, mais aussi par l'intermédiaire de réseaux de co-occurrence. Nous sommes parmi les premiers à avoir constaté que la concentration de Hg est corrélée négativement avec la richesse et la diversité des champignons du sol dans un environnement naturel. Nos travaux ont d'ailleurs permis de mettre en avant que certains groupes de champignons pourraient être favorisés par l'enrichissement en Hg dans le sol comme le genre *Trichoderma*, ou encore les classes fongiques *Eurotiomycetes* et *Sordariomycetes*.

Cependant, de nombreuses OTUs ne sont pas assignées du fait du manque d'informations dans les bases de données, ce qui limite les résultats. Les données de séquençages pourraient être à nouveau confrontées à des bases de données actualisées dans un avenir proche pour identifier davantage d'organismes. Les réseaux de co-occurrence sont un nouveau moyen d'estimer le rôle des organismes au sein de leur communauté bien qu'une quantité très importante de données soit nécessaire pour soutenir le modèle. Par exemple, pour les bactéries, la quantité de données était insuffisante pour répondre à nos critères de qualité. De plus, il est bon de relativiser la qualité explicative des modèles et pour ce faire, je citerais George Box (Célèbre statisticien, 1919 – 2013) : « Tous les modèles sont faux, mais certains sont utiles ». Si le Hg a pu être corrélé aux indices de diversité pour les champignons du sol (pas de corrélation pour les bactéries) ce n'est pas le cas pour les autres habitats. Or, l'estimation de la biodisponibilité pour les microorganismes du Hg du sol et de l'atmosphère n'est pas un paramètre qui a pu être déterminé, et qui pourtant, est un paramètre essentiel pour indiquer son potentiel toxique vis-à-vis des microorganismes. Par ailleurs, bien que les paramètres du sol aient été préalablement établis et présentent une grande homogénéité dans le sol de Tavaux, si des mesures (ICP-AES) avaient été réalisées pour chaque point, il aurait été possible de corréler d'autres paramètres du sol avec la diversité des communautés.

#### 4.2.3 Contraintes du metabarcoding en génomique environnementale

La miniaturisation de la chimie de séquençage de la technologie Roche 454 semble avoir atteint ses limites, de fait les projets les plus récents font de plus en plus appel à des technologies de très haut débit telles que la technologie Illumina MiSeq. En effet, le faible débit de la

technologie Roche 454 conduit à sous-estimer la diversité microbienne des habitats étudiés (Rothberg & Leamon, 2008). De plus, avec la baisse du prix des séquençages, les technologies de très haut débit sont de plus en plus abordables. Notons cependant que la faible taille des amplicons générés par la technologie Illumina MiSeq (100 à 300 pb) comparativement à celle produite par pyroséquençage 454 (~ 700 pb) peut nuire à la qualité de l'assignement taxonomique subséquent. De plus, malgré les progrès importants du séquençage, des erreurs sont encore à redouter avec les technologies de secondes générations.

Quelle que soit la technologie utilisée, la génomique environnementale génère une quantité importante de données inédites qui permet de plus en plus d'entrevoir une approche holistique des communautés microbiennes. Cependant, les données générées ne sont informatives que dans le contexte d'une bonne connaissance préalable des microorganismes détectés en termes d'autoécologie et d'histoire naturelle (Peay, 2014). L'autoécologie est définie comme l'étude et la description des organismes et des objets naturels, et plus spécifiquement, leurs origines, leurs évolutions, et leurs interactions, tandis que l'histoire naturelle en écologie étudie les relations entre les individus ou les espèces et leur environnement. Les approches de metabarcoding ne sont donc pas suffisantes en elles-mêmes, mais nécessitent et mettent à contribution de nombreux domaines de la Science.

Différents verrous en amont et en aval du séquençage viennent également limiter la performance de la génomique environnementale. Premièrement, l'extraction d'ADN est une étape cruciale qui peut être extrêmement délicate en fonction des habitats étudiés. En effet, la présence de polyphénols et de polysaccharides est un véritable handicap pour la production d'ADN de qualité dans la phyllosphère (Healey *et al.*, 2014). De plus, certains substrats perturbés par des activités industrielles inhibent également la biologie moléculaire nécessaire pour la production des séquences ADN. En outre, le metabarcoding implique la sélection d'amorces discriminantes qui vont permettre l'amplification spécifique des communautés bactériennes ou fongiques, cependant des organismes ou organites non microbiens peuvent avoir une forte proximité avec les marqueurs génétiques ciblés. Notamment, les chloroplastes peuvent être amplifiés par les amorces censées être spécifiques des bactéries, spécialement dans les habitats de la phyllosphère. Par opposition, une trop grande discrimination due aux amorces pourrait entraîner l'amplification préférentielle de certains groupes par rapport à d'autres. La sélection des amorces est une étape cruciale pour de bons résultats de séquençage (Beckers *et al.*, 2016). Pour le séquençage des communautés bactériennes, l'amorce 799F de l'ARNr 16S semble faire consensus pour la détection spécifique de bactéries (Redford & Fierer, 2009; Maignien *et al.*, 2014; Perazzolli *et al.*, 2014; Kembel *et al.*, 2014; Copeland *et al.*, 2015),

excluant cependant la détection des cyanobactéries. Les analyses post-séquençages permettent toutefois de filtrer les « contaminations » non microbiennes. Par ailleurs, la notion de reliquat d'ADN évoquée par Carini et ses collaborateurs (2016) implique que l'ADN récupéré dans l'environnement ne provienne pas que de cellules vivantes puisque l'ADN met un certain temps à se dégrader. Il est donc possible qu'une partie de l'ADN détecté appartienne à une communauté d'organismes morts depuis peu. Plus problématique, l'ADN en cours de dégradation peut être interprété comme de l'ADN appartenant à des OTUs différentes alors qu'il s'agit simplement de différents stades de dégradations de l'ADN. Cependant, avec différents filtres, lors de l'analyse bio-informatique, il est possible de façonner des OTUs qui vont parer à ce problème et de filtrer les artéfacts d'ADN. Finalement, il faut se souvenir que l'information obtenue par le séquençage est tout à fait dépendante de la qualité des bases de données génomiques mises à disposition par les communautés scientifiques. De fait, l'assignement taxonomique implique un travail de curage et de renouvellement régulier des bases de données. Qui plus est, les marqueurs génétiques pour l'identification taxonomique ITS et 16S, préalablement fixés par la communauté scientifique, sont des institutions difficilement modifiables. Bien que relativement efficaces, ces marqueurs offrent des résolutions variables pour l'assignement en fonction des groupes de microorganismes, certains taxons étant plus difficiles à distinguer au niveau de l'espèce que d'autres.

#### **4.2.4 La perspective du « shotgun metagenomic sequencing »**

Cette méthode implique également d'extraire l'ADN des cellules présentes dans un habitat, mais ne se contente pas ensuite d'amplifier une partie ciblée de l'ADN. En effet, c'est la totalité de l'ADN présent dans l'échantillon, provenant de la totalité des organismes, microbiens ou non, qui est alors séquencée. Ensuite, cet amas d'ADN est brisé en fragments puis séquencés indépendamment. Ainsi, les données générées permettent non seulement une caractérisation taxonomique d'organismes présents, mais également la détermination des caractéristiques fonctionnelles potentielles des microorganismes en présence (Figure 62).

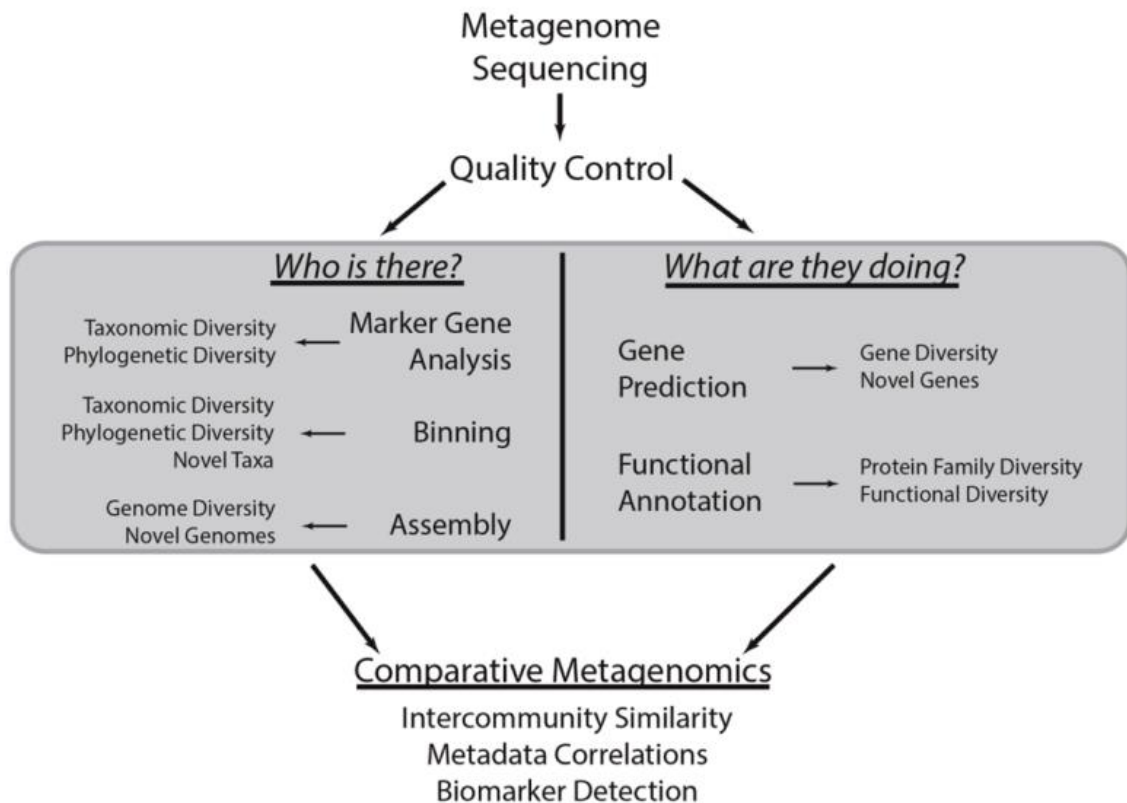


Figure 62 : Les stratégies classiques en métagénomique analytique (Sharpton, 2014).

- L'analyse de marqueurs génétiques correspond à la démarche utilisée en métabarcoding et implique de comparer chaque séquence obtenue à une base de données de références taxonomiques et phylogénétiques.
- Le « binning » ou assignement permet par diverses méthodes d'ordonner les séquences en les classant par profils taxonomiques, profils génomiques, profils de recouvrement (« coverage profile ») ou encore d'abondances phylogénétiques. Cette étape permet d'obtenir une plus haute résolution lors de l'assignement taxonomique et réduit la complexité de l'amas de données ce qui facilite les étapes suivantes.
- L'« assembly » ou « assemblage » consiste à mettre bout à bout les fragments de séquences colinéaires (réaliser des contigs) à partir des différentes séquences amplifiées pour reconstituer de longues séquences continues voire des génomes entiers.
- La prédiction de gènes repose sur l'utilisation d'algorithmes de prédiction sur les séquences amplifiées pour déterminer des sous-séquences potentiellement codantes, notamment par la détection des « codons start » initiant la transcription (et donc la production de protéines) et des « codons stop » y mettant fin.
- L'annotation fonctionnelle compare les gènes prédits à des bases de données pour assigner le gène à une famille de protéines et donc déterminer la fonction putative associée.

Voici un exemple de ce qu'il est possible d'obtenir par cette approche (Figure 63) :



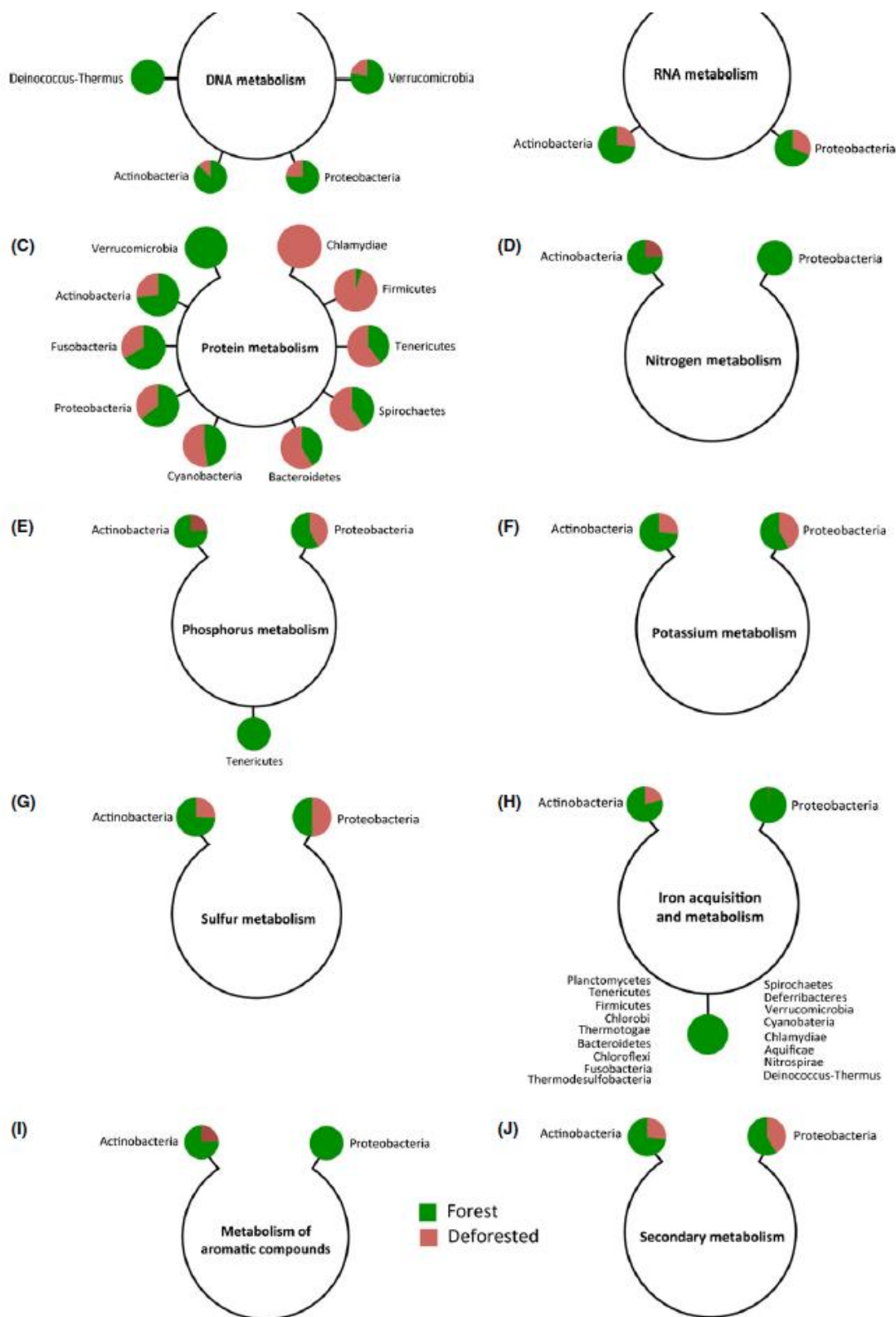
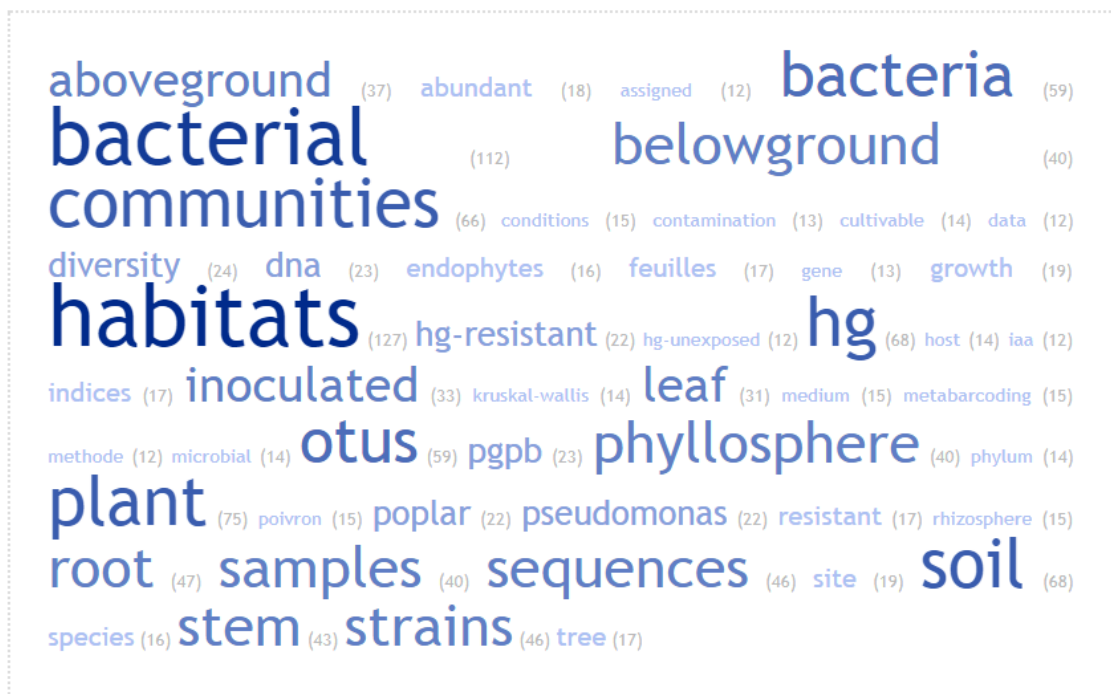


Figure 63 : Cas de la déforestation Amazonienne. Proportion des groupes bactériens associés avec : (A) le métabolisme de l'ADN, (B) le métabolisme de l'ARN, (C) le métabolisme des protéines, (D) le métabolisme de l'N, (E) le métabolisme du P, (F) le métabolisme du K, (G) le métabolisme du S, (H) le métabolisme et l'acquisition du Fe, (I) le métabolisme des composés aromatiques, et (J) le métabolisme secondaire ; estimés dans les sols forestiers et après déforestation. Les cercles représentent l'abondance relative du phylum bactérien en comparant le nombre de séquences appartenant au phylum au nombre total de séquences bactériennes classées dans la catégorie fonctionnelle (Navarrete *et al.*, 2015)



## Chapitre 4 : deuxième partie

---



*Analyse sémantique du chapitre 4 : deuxième partie*



### **4.3 L'approche culture dépendante permet l'isolement de PGPB résistantes au Hg issues d'une peupleraie se développant sur un sol enrichi en Hg**


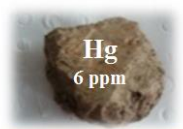




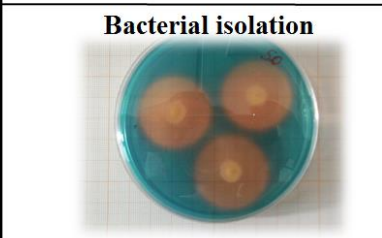
#### **4.3.1 Contexte et publication**

Les plantes et les microorganismes entretiennent des relations étroites qui peuvent être conflictuelles (organismes parasites), mutuellement bénéfiques (organismes symbiotiques), ou neutres (organismes commensales). Parmi les bactéries, les PGPB qui, dans l'environnement, améliorent la croissance des plantes, sont un sujet d'étude important pour les microbiologistes. En effet, l'isolement, la caractérisation et l'inoculation des PGPB permettent d'augmenter nos connaissances sur les symbioses entre plantes et microorganismes dans leur environnement naturel, mais aussi, de tester nos capacités à façonner les interactions entre bactéries et plantes dans l'optique d'optimiser les interactions bénéfiques pour la plante. Dans le cadre du phytomanagement, les bactéries PGPB jouent un rôle important par leurs symbioses avec le couvert végétal. Dans le cadre général de la pollution par les ETMs, leur étude permet d'envisager une amélioration de l'implantation du couvert et/ou une amélioration de la phytoextraction et de la phytostabilisation. Toutefois, la pollution environnementale liée au Hg ne permet pas d'espérer une phytoextraction efficace, c'est la phytostabilisation du Hg qui est privilégiée. Le Hg a en outre la particularité d'être facilement libéré dans l'atmosphère depuis le sol (supposément, essentiellement en été, quand les activités microbiologiques et photochimiques seraient maximales). Ceci pose la question de la capacité d'interception de cette pollution atmosphérique par la phyllosphère du couvert végétal et du rôle des microorganismes (notamment PGPB) de la phyllosphère dans cette interception. En effet, les bactéries de la phyllosphère, et plus précisément du phylloplan jouent pour une part encore mal connue sur les échanges entre la feuille et l'atmosphère.

Ainsi, la friche industrielle de Tavaux nous permet d'étudier, dans un environnement « naturel » et dans un contexte de pollution industrielle, les communautés de bactéries associées au peuplier (*Populus trichocarpa* X *Populus maximowiczii*). Plus spécifiquement, nous avons étudié les PGPB résistantes au Hg provenant aussi bien de la rhizosphère que de la phyllosphère. Puis, l'effet des isolats les plus prometteurs sur la croissance et l'accumulation de Hg atmosphérique a été testé avec notre plante modèle *Capsicum annuum* (poivron).

## Bacterial diversity associated with poplar trees grown on a Hg-contaminated site: community characterization and isolation of Hg-resistant plant growth-promoting bacteria

Alexis Durand<sup>a</sup>, François Maillard<sup>a</sup>, Vanessa Alvarez-Lopez<sup>a</sup>, Sarah Guinchard<sup>a</sup>, Coralie Bertheau<sup>a</sup>, Benoit Valot<sup>a</sup>, Damien Blaudez<sup>b</sup>, Michel Chalot<sup>a,c</sup>

Tavaux poplar plantation	Habitats studied	Illumina MiSeq sequencing
	 Soil  Root	
	 Stem  Leaf	

<sup>a</sup> Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France

<sup>b</sup> Université de Lorraine, UMR CNRS 7360 Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506, Vandœuvre-lès-Nancy, France

<sup>c</sup> Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

**\*Corresponding author:** Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France

Tel: +33 3 81 99 46 76,

Email: [michel.chalot@univ-fcomte.fr](mailto:michel.chalot@univ-fcomte.fr)

## Abstract

Large dumps used to store industrial tailings are unable to generate significant vegetated surfaces after they have been abandoned, suggesting that these surfaces become biologically infertile. Revegetation of tailings dumps produced by various industrial activities is thus necessary to prevent dust storms and erosion and to restore soil ecosystem services. However, little is known about the microbial colonization and community structure of revegetated tailings following site restoration. In this study, we investigated the rhizosphere and phyllosphere bacterial communities of a poplar tree plantation at a Hg contaminated site. We used Illumina-based sequencing combined with culture-dependent approaches to isolate and characterize plant growth-promoting bacteria (PGPB) and Hg-resistant bacteria. The genus *Streptomyces* was highly specific to the root community, accounting for 24.4 % of the relative abundance but only representing 0.8 % of the soil community, whereas OTUs from the *Chloroflexi* phylum were essentially detected in the soil community. Aboveground habitats were dominated by bacteria from the *Deinococcus-Thermus* phylum, which were not detected in belowground habitats. Leaf and stem habitats were characterized by several dominant OTUs, such as those from the phylum *Firmicutes* in the stems or from the genera *Methylobacterium*, *Kineococcus*, *Sphingomonas* and *Hymenobacter* in the leaves. Belowground habitats host more cultivable Hg-resistant bacteria than aboveground habitats and more Hg-resistant bacteria were found on the episphere than in endospheric habitats. Hg-resistant isolates exhibiting plant growth-promoting (PGP) traits were incubated and increased root dry biomass but didn't increased Hg concentration in leaves. The N<sub>2</sub>-fixing and Hg-resistant species *Pseudomonas graminis*, observed in the poplar phyllosphere, may be a key microorganism for the restoration of industrial tailings dumps.

**Keywords:** Phytomanagement, Poplar habitats, Trace elements, Plant growth-promoting bacteria, Mercury-resistant bacteria

## 1. Introduction

Soil contamination by metal(oids) and trace elements (TEs) such as Ag, As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, or Zn is a threat to ecosystem stability and a risk to human health. In 2011, 127,000 sites in 33 European Union countries were confirmed to have contaminated soils, and approximately 45 % of these sites (58,000) were under remediation project management to reduce associated risk (remediation) [1]. Data published in 2016 showed that 6.24 % (137,000 km<sup>2</sup>) of European agricultural lands were unsafe for food production, requiring local assessment and eventual remediation [2].

Phytomanagement-based restoration programs for contaminated soils may use woody plant species that are readily colonized by essential microorganisms [3]. However, knowledge of these associated microbial communities remains scarce, particularly with respect to aboveground tissues. Among the microorganisms that colonize the rhizosphere and the phyllosphere of a plant, some play important roles in plant fitness and are collectively described as plant growth-promoting bacteria (PGPB) [4–6]. PGPB directly benefit host plants via hormone production (e.g., indole acetic acid, cytokinin, and zeatin) and improved nutrition and indirectly by acting as biocontrol agents, inducing systemic resistance and ethylene stress resistance [5, 7–11]. Belowground, various bacteria live in, on, or around plant tissues and may stimulate plant growth, nutrition and health [12], while aboveground, leaves and stems provide a broad habitat for bacteria and may host specific PGPB in or on tissues [8]. In the soil, free-living bacteria of various genera exert beneficial effects on plants [13, 14] and are classified as rhizospheric PGPB. Widely, plant-associated bacteria include endophytic bacteria, which colonize internal tissues of plants. They are originating from the epiphytic bacterial communities of the rhizosphere and phyllosphere as well as from endophyte-infested seeds or planting materials [15]. These bacterial communities may host endophytic PGPB which are represented by numerous genera [16–18]. Other bacterial endophytes that are only localized in specific structures, termed nodules, are referred to as symbiotic PGPB [6, 13, 18, 19]. Aboveground, phyllospheric PGPB are subjected to fitness stresses that are very different than those found belowground and may result in genetic adaptations [20]. Whereas our understanding of these bacterial communities is limited [21], several phyllospheric PGPB have been previously described [5, 21]. However, gaining an understanding of the structure and composition of microbial communities *in situ* is difficult due to the diversity and complexity of these communities. Metabarcoding using high-throughput sequencing technologies offers a solution to describe the bacterial communities associated with environmental habitats with high



resolution. However, culture-dependent approaches are far from obsolete. Indeed, functional characterization must be performed to select the best PGPB, and bacterial isolation therefore remains unavoidable.

In this study, we combined a metabarcoding approach that employs a high-throughput Illumina MiSeq platform [22, 23] and culture-dependent approaches to investigate bacterial diversity and isolate Hg-resistant PGPB. We hypothesized that the presence of a poplar tree plantation on an industrial dump would significantly and differentially shape the bacterial communities from the different soils and poplar habitats.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Site description

The study site is located in Tavaux, France, in Western Europe along a major river and is surrounded by several urban aggregates. A detailed map of the site is provided by Maillard et al. (2016). ICP-AES analyses revealed that total Hg and total As were significantly increased in the dump compared to the levels in control soil nearby, details of soil analyses of the lagoon are provided in Zappelini et al. (2015). The poplar cultivar Skado (*P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*) was planted in 2011 as a short rotation coppice (2200 stems ha<sup>-1</sup>), fully described in Durand et al. (2017).

### 2.2. Metabarcoding analysis

Sampling for metabarcoding analysis was carried out in August 2014 on the 4 different habitats: bulk soil, root, stem and leaf. Samples were collected from six random trees that were selected on three replicated plots (2 trees per plot), with DNA extracted as previously described in Durand et al. (2017). Briefly, environmental DNA was extracted from samples within 2 months after sampling using an adapted Cetyl trimethylammonium bromide/chloroform/isoamyl alcohol protocol (Lefort and Douglas 1999; Healey et al. 2014) for root, stem and leaf samples, whereas environmental DNA from soil samples was extracted using a PowerSoil DNA Isolation Kit following the manufacturer's instructions (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA USA). Extracted DNA was purified using a Power Clean® Pro DNA Clean-Up Kit (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA USA). Equimolar DNA pools were adjusted to 10 ng µl<sup>-1</sup>, and sequencing of the bacterial 16S region was performed on an Illumina MiSeq platform (Microsynth AG, Switzerland). PCR amplification of the partial 16S gene was performed using the bacterial primers 799f (5'- AAC MGG ATT AGA TAC CCK G -3') and 1115r (5'- AGG GTT GCG CTC GTT G -3'), which amplify the V5-V6 region [26].

These primers target a section of the bacterial 16S region and generate a small amplicon (~300 bp) that is appropriate for Illumina sequencing.

Reads were assigned to each sample according to a unique barcode, and contigs were then assigned using the MOTHUR pipeline [27]. Raw reads were filtered by length and quality. 16S reads were pre-clustered using sumaclust [28] at 0.99 identity. Only sequences with at least 8 reads were retained (76 % of initial reads). The retained 16S sequences were aligned with those present in the Silva database to remove non-16S sequences, and plant DNA contamination was removed by suppressing reads identified as k\_\_Bacteria (100), p\_\_Cyanobacteria (100), c\_\_Chloroplast (100), o\_\_Streptophyta (100), and unclassified (100). Taxonomic assignments were made using a Bayesian approach [29] with the Greengenes database [30]. Finally, OTUs were derived using the Needleman distance and average neighbor clustering at a distance of 0.03.

Diversity parameters were calculated based on a dataset in which numbers of reads per sample were rarefied to 3,000 reads per sample. We calculated rarefaction curves at a 97 % similarity level to verify whether the amount of sequencing reflected the diversity of the original microbial communities. Rarefaction curves were created using the “rarefaction” function and the Vegan package in R [31]. A 2-dimensional non-metric multi-dimensional scaling (NMDS) plot was calculated using the Bray Curtis method ( $k = 3$ ) based on the standardized (Wisconsin double) and square root transformation of OTU abundance using the “metaMDS” function in the Vegan package. We used ANalysis Of SIMilarities (ANOSIM) to obtain P (i.e., significance levels) and R (i.e., the strength of the factors on the samples) values. These results were paired with a heatmap of Spearman's correlations between the 20 most abundant OTUs in each habitat (a total 59 OTUs) created with “heatmap.2” from the “gplots” package. In addition, in the same pool of OTUs, we use the “multipatt” function of the “indicspecies” package to evaluate the best bioindicator OTUs [32]. OTU-based analysis of alpha diversity was performed with the following functions using Mothur calculators: “sobs”, “chao”, “shannoneven”, “shannon”, “invsimpson”, “coverage” and “nseqs” (Schloss et al. 2009). These estimates included observed OTU richness, Chao estimation [33], Shannon diversity index, inverse of Simpson diversity index, and measure of evenness based on the Shannon index and coverage. The coverage calculator returns Good's coverage for an OTU definition [34]. Coverage was calculated using the following equation:  $C = [1 - (n/N)] * 100$  (%), where  $n$  is the number of OTUs and  $N$  is the number of sequences. The numbers of OTUs that were shared between habitats were visualized using Venn diagrams that were generated in

Mothur with the function “venn”. We considered an OTU to be present in a compartment if it was present in at least 25 % of the habitat samples.

### ***2.3. Isolation and characterization of Hg-resistant bacterial strains***

Bacterial suspensions from all habitats were further fractioned into 1-ml aliquots, then transferred into sterile test tubes containing 9 ml of PBS. Microbial suspensions were serially diluted to determine the number of cultivable bacteria (colony-forming units (CFU)) by spread-plating them onto 1/10 rich medium (869) as well as onto environmental medium (284) ([35]. Cultivabilities of Hg-resistant bacteria were determined using the same media supplemented with 0, 2 or 10  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  [36]. The agar plates were then incubated in the dark at 27°C for 6 days. The number of bacteria was expressed as  $\log(\text{CFU}) \text{ g}^{-1}$  dry weight (DW) of sample. Hg-resistant colonies were isolated and purified by subculture on Hg-enriched 1/10 869 or 284 medium. A bacterial collection was further established by growing each previous isolated strains in 6 ml of Luria Bertani (LB) broth (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) for 15 h on a rotatory shaker (150 rpm) at 30°C and stored in 25 % sterile glycerol containing 75 % brain heart infusion broth (Roth, Karlsruhe, Germany) at -80°C for further analyses.

Each Hg-resistant isolate was cultured in 15 ml of LB medium for 24 h on a rotatory shaker (120 rpm) at 27°C. After centrifugation, DNA was extracted from the pellets using an EZNA bacterial DNA isolation kit (OMEGA Bio-tek, Inc, Norcross, Georgia, USA) according to the manufacturer’s instructions. The BOX-PCR fingerprinting method was used to group genotypic profiles at a similarity level of 97 % as previously described [37]. One strain was selected for each BOX-group and 16S rDNA genes were amplified from 5  $\mu\text{l}$  of bacterial DNA in a final reaction volume of 50  $\mu\text{l}$  containing 25  $\mu\text{l}$  of 2x PCR master mix (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) and each universal primer at 0.5  $\mu\text{M}$  (Eurofins Genomics, Paris, France), specifically 27f (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3') and 1492r (5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3') [38]. DNA amplification was carried out in a thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) under the following conditions: 4 min at 94°C, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 2 min at 72°C, with an additional 15-min cycle at 72°C [39]. All 16S rDNA PCR products were sequenced by Sanger sequencing (Genewiz Beckman Coulter Genomics, United Kingdom). DNA sequences were edited with BioEdit software v7.2.6. [40] screened against the GenBank database using the BLASTn tool at the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and then aligned with reference sequences of bacteria (LN551925, KR922297, HQ256858, KU587965, KU523561, JX827229, HQ256858, HQ224627, KT825724, NR\_028626, LN774179, JF496259,

KR476438, JQ956529, FJ380956, and KC790245) using Clustal W [41] as implemented in Bioedit. Neighbour Joining (NJ) tree reconstructions were produced using MEGA 5 [42]. The most appropriate model of 16S sequence evolution was K2P model [43].

Each isolate of the bacterial collection was screened for the following plant growth-promoting traits: siderophore production, IAA synthesis and phosphate solubilization. The siderophore production of each bacterial strain was determined using chrome azurol sulfonate (CAS) agar medium [44, 45]. After 5 days of incubation on CAS medium at 30°C, a red-orange halo around colonies indicated the production of siderophores. For each strain, the ratio between the diameter of the halo and the diameter of colony was recorded. The IAA synthesis of each bacterial strain was determined using Salkowski's reagent (1 ml of 0.5 M FeCl<sub>3</sub> in 50 ml of 35 % HClO<sub>4</sub>) as described by [46]. The phosphate-solubilizing capacity of strains was determined on Pikovskaya medium [47]. After 5 days of incubation at 30°C, a discolored halo around colonies demonstrated phosphate solubilization. For each strain, the ratio between the halo diameter and the diameter of colony was recorded. Additionally, MICs (minimal inhibitory concentrations) of Hg were determined for each isolated strain. Briefly, microtitration plates were prepared using 2-fold dilutions of Hg in LB liquid broth, from 0 to 256 µM Hg. The strain *Pseudomonas aeruginosa* PA14, which is resistant to Hg above 256 µM, was used as a positive control. Each well was inoculated with 2 µl of a bacterial suspension, and plates were incubated for 48 h at 27 °C on a rotatory shaker table (180 rpm). After incubation, the bacterial growth was evaluated by measuring the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>). Nitrogen fixation ability was evaluated using N-free semisolid malate medium (NFb) [48] inoculated with the assayed strains. After 10 days, strains that successfully grew were transferred to fresh NFb medium, and after 7 days of incubation, the characteristic pellicles of diazotrophic bacteria were observed.

Using the previous extracted bacterial DNA, the presence of the genes *merA* and *nifH* in the genome of each strain was assayed. PCR amplification of the *merA* gene was performed using 3 µl of bacterial DNA in a final volume of 20 µl that also contained 10 µl of 2x PCR master mix (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) and each primer at 0.5 µM, specifically *merA*2F (5'- CCT GCG TCA ACG TCG GCT G -3') and *merA*2R (5'- GCG ATC AGG CAG CGG TCG AA -3') [49]. DNA amplification was carried out in a thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) using the following conditions: 10 min at 95°C, followed by 35 cycles of 30 sec at 95 °C, 15 sec at 63 °C, and 30 sec at 72°C, with an additional 5-min incubation at 72 °C. PCR amplification of the *nifH* gene was performed in a final volume of 25 µl containing 5 µl of bacterial DNA, 12.5 µl of 2x PCR master mix, and each primer at 0.5 µM including *nifH*F (5'- TAC GGN AAR GGS GGN ATC GGC AA -3')

and nifHI (5'- AGC ATG TCY TCS AGY TCN TCC A -3') [50]. DNA amplification was carried out in a thermocycler under the following conditions: 4 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 53.5 °C, and 2 min at 72 °C, with an additional 15-min incubation at 72 °C.

#### **2.4. Pot experiment with Hg-resistant bacteria and pepper**

*Capsicum annuum* seeds (Yolo Wonder Pepper) were planted in peat (Brill, Germany) and grown for 68 days. In a preliminary experiment, this plant species was found to be the highest Hg-accumulator among the other edible or woody crops tested. Next, a 46-day pot experiment was performed. Each mesocosm was defined as a pepper plant growing in a 0.5 liter pot in a growth chamber (photoperiod, 16 h; temperature, 18 °C (night) and 22 °C (day); relative humidity, 60-80 %; photosynthetic photon flux density, 250 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). In total, 16 *Capsicum annuum* plants were used for each of the following treatments: uninoculated and Hg-unexposed (ni-); inoculated and Hg-unexposed Hg (i-); uninoculated and Hg-exposed (ni+); and inoculated and Hg-exposed (i+). Hg-unexposed plants (ni- and i-) were grown in the same growth chamber, while Hg-exposed plants (ni+ and i+) were grown in a separate growth chamber. Hg-enriched soil (6.38 mg kg<sup>-1</sup> Hg) from the industrial tailings described above was added to the Hg-contaminated growth chamber as previously described (Assad et al., 2016). The soil was not in direct contact with the plants in any way but provided an atmospheric enrichment with Hg, similar to that observed in the natural environment. Atmospheric Hg in the contaminated and uncontaminated growth chambers was measured at 21.0 and 3.48 ng m<sup>-3</sup>, respectively. Using the previously isolated bacteria stored at -80 °C, two bacterial consortia were produced to inoculate both the belowground and aboveground compartments of *Capsicum annuum*. The bacteria were grown to saturation in liquid 869 media for 24 h at 30 °C with shaking at 200 rpm. To generate the final phyllospheric consortium (PC), four *Pseudomonas graminis* strains (AT3, AT7, AT8 and AT9) were added in equal proportions and adjusted to a final OD<sub>600</sub> of 1 in 0.5 l of PBS. To generate the final belowground consortium (BC), two *Pseudomonas* sp. strains (FT79, FT82) and two *Bacillus subtilis* strains (FT97 and FT50) were used in equal proportions and adjusted to a final OD<sub>600</sub> of 1 in 0.5 l of PBS. For each plant, 4.8 ml of PC was sprayed onto the leaves, and 10 ml of BC was added near the base of the stems. The same amounts of PBS were added using the same methods with uninoculated plants. In addition, unplanted control pots were prepared.

Stem lengths and the amounts of Hg in older leaves were measured at 0, 15, 32 and 46 days. In addition, at harvest (46 days), dry biomass of belowground and aboveground tissues

plants were measured as well as the total Hg content in younger leaves, fruits, stem and roots. All samples were dried at room temperature and ground into a homogenous powder in a Mixer Mill for 3 min at 30 Hz (model MM400; Retsch Inc., Newtown, Pennsylvania, USA). We used Biolog Ecoplate™ microplates (Biolog Inc., Hayward, CA.) following the manufacturer's recommendations to determine the metabolic capacity of soil microbial communities under the different treatments.

### **2.5. Hg analysis in the substrate and biomass**

Hg was measured in the soil and pepper plant samples using an AMA-254 (Advanced Mercury Analyzer) cold vapor atomic absorption (CV-AAS) Hg analyzer (Altec Co., Czech Republic) under the standard conditions recommended by the manufacturer (120 sec drying, 150 sec heating, and 45 sec cooling). The validity of the analytical method was assessed using certified reference material (CRM), specifically Oriental Basma Tobacco Leaves (INCT-OBTL-5) with a certified Hg content of  $20.9 \pm 1.3$  ng g<sup>-1</sup> DM [51]. Quality controls were regularly performed as described elsewhere [52].

### **2.6. General statistical analysis**

The Shapiro test and the Bartlett test were used to check the normality and homoscedasticity of the data, respectively. Our data verifying normality and homoscedasticity were assessed using ANalysis Of VAriance (ANOVA). In other cases the data were examined using the Kruskal-Wallis test. Statistical analyses were performed with R software, version 3.3.2 [53].

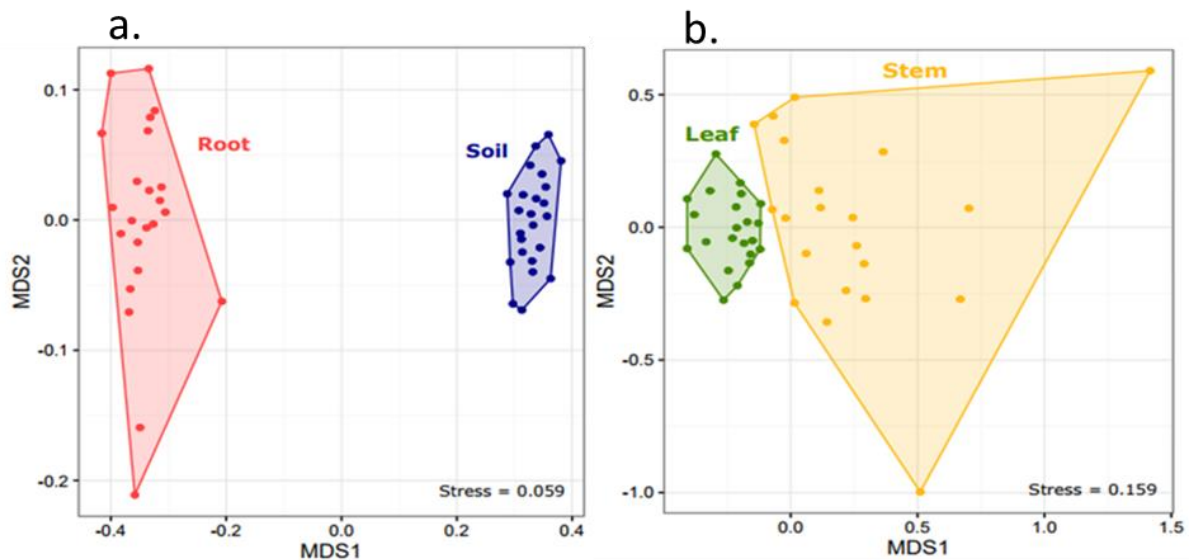
## **3. Results**

### **3.1. Contrasting microbial communities in poplar tree habitats revealed by metabarcoding**

Illumina MiSeq sequencing of bacterial 16S rRNA genes from environmental DNA isolated from four habitats (soil, root, stem and leaf of poplar trees) yielded 4,437,316 sequences. After filtering artifactual, chimeric and unaligned sequences, 76 % (3,222,285) of the initial sequences were retained, distributed into 2,699 OTUs. After the removal of non-bacterial OTUs, 2,661,227 bacterial sequences remained and composed the operational dataset. Subsampling of the dataset was adjusted to 3,000 reads clustered in 2,414 OTUs (Table S1). Our results showed large variations in total OTU numbers in aboveground *versus* belowground samples.

Rarefaction curve analysis, which assesses species richness from the results of sampling, showed that all curves from each habitat were almost parallel with the x-axis, indicating that

overall bacterial diversity was well represented (Fig. S1). Visualization of a global analysis of the four habitats using NMDS plots was difficult due to the gap between the aboveground and belowground habitats; therefore, they were represented separately. The NMDS plot of the belowground habitats (root and soil habitats) showed clear clustering of the two communities (Fig. 1a), while the communities of aboveground habitats (stem and leaf habitat) clustered more closely (Fig. 1b). ANOSIM analyses confirmed a clear separation between the root and soil bacterial communities ( $R = 1$ ;  $P$  value = 0.001) while a less marked dissimilarity between the stem and leaf communities was observed ( $R = 0.61$ ;  $P$  value = 0.001). Roots (Fig. 1a) and stems (Fig. 1b) data exhibited the greatest between-sample variations, evidenced by their higher scattering.



**Figure 1:** NMDS plot of bacterial communities associated with the leaf, stem, root and soil habitats using the Bray-Curtis dissimilarity measure and 1,000 iterations. Each point represents the bacterial community of a given sample, a: belowground habitats; b: aboveground habitats.

Diversity and richness indices were calculated for each habitat (Table 1). Most indices occurred in the order soil > root > leaf  $\geq$  stem, revealing that aboveground habitats were significantly less rich and abundant than belowground habitats. Comparing belowground habitats, soil appeared to be significantly more diverse and rich than the root habitat, while comparing the aboveground compartments stem habitat was as rich or richer than the leaf habitat but less diverse. Indeed, the Chao1 and Shannon indices indicated that the highest richness and diversity of the microbial community were present in soil samples, followed by the root microbiome. Soil reads were evenly spread among diverse OTUs, as revealed by high Simpson indices and high evenness. The Venn diagram highlights shared and unique OTUs for each habitat (Fig. S2). The sums of the total observed bacterial OTUs in the four sample types

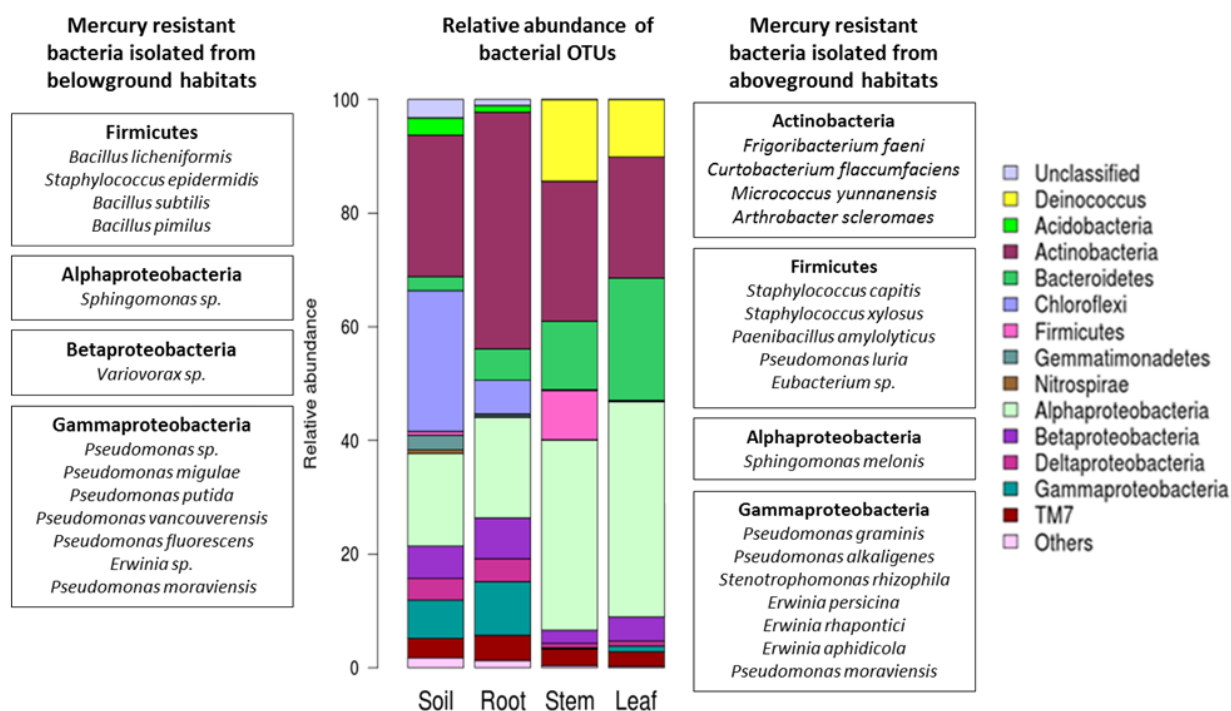
in the poplar tree plots were 475, 337, 94 and 77 for soil, root, stem and leaf samples, respectively (Fig. S2). Overall, 9 OTUs (1.4 %) were shared by all compartments, and only 4.2 % of OTUs were found in both belowground and aboveground habitats. Moreover, aboveground habitats shared 50.8 % of their OTUs, while belowground habitats shared 43.9 % of their OTUs. Soil samples contained the highest proportions of unique OTUs (47.3 %), followed by leaf (31.2 %), root (25.2 %) and stem (18.1 %) samples.

**Table 1:** Alpha diversity estimations of bacterial communities from the four poplar habitats. All diversity statistics were calculated using an OTU threshold of  $\geq 97$  % sequence similarity on randomly subsampled data at the lower sample size (3,000 reads). Mean values followed by different letters are significantly different at  $P < 0.05$  (Kruskal-Wallis comparison test). Numbers between brackets indicate the standard error (SE).

Habitats	Soil	Root	Stem	Leaf
Mean reads per sample	41,700	34,090	17,741	13,793
Subsample size (number of samples)	3,000 (24)	3,000 (23)	3,000 (21)	3,000 (22)
Observed OTUs	671 <sup>a</sup> ( $\pm 4$ )	455 <sup>b</sup> ( $\pm 7$ )	90 <sup>c</sup> ( $\pm 1$ )	93 <sup>c</sup> ( $\pm 3$ )
Chao1 OTUs definition	1,112 <sup>a</sup> ( $\pm 15$ )	750 <sup>b</sup> ( $\pm 15$ )	138 <sup>c</sup> ( $\pm 2$ )	128 <sup>c</sup> ( $\pm 7$ )
Shannon Index (H)	5.50 <sup>a</sup> ( $\pm 0.02$ )	4.79 <sup>b</sup> ( $\pm 0.04$ )	2.94 <sup>d</sup> ( $\pm 0.01$ )	3.13 <sup>c</sup> ( $\pm 0.04$ )
Inverse Simpson index (1/D)	75.70 <sup>a</sup> ( $\pm 2.60$ )	40.56 <sup>b</sup> ( $\pm 2.75$ )	11.83 <sup>d</sup> ( $\pm 0.13$ )	14.18 <sup>c</sup> ( $\pm 0.60$ )
Shannon Index Evenness (E)	0.846 <sup>a</sup> ( $\pm 0.001$ )	0.782 <sup>b</sup> ( $\pm 0.005$ )	0.655 <sup>d</sup> ( $\pm 0.001$ )	0.694 <sup>c</sup> ( $\pm 0.006$ )

Through environmental 16S rDNA sequencing, bacterial communities from the four habitats (soil, root, stem and leaf) were categorized into 30 phyla and 80 classes, the most abundant of which are shown in Fig. 2. The entire dataset was dominated by *Actinobacteria* (28 %) and *Alphaproteobacteria* (26 %). The largest proportion of *Actinobacteria* was found in the root habitat (41.7 %) compared to the other compartments (Kruskal-Wallis  $X^2 = 45.8$ ;  $P < 1.3 \times 10^{-11}$ ), and the aboveground samples contained more *Alphaproteobacteria* (35.7 %) compared to belowground samples (Kruskal-Wallis  $X^2 = 59.7$ ;  $P < 1.1 \times 10^{-14}$ ). Altogether, belowground habitats were enriched for *Acidobacteria* (Kruskal-Wallis  $X^2 = 68.9$ ;  $P < 2.2 \times 10^{-16}$ ), *Chloroflexi* (Kruskal-Wallis  $X^2 = 66.9$ ;  $P < 2.9 \times 10^{-16}$ ), *Betaproteobacteria* (Kruskal-Wallis  $X^2 = 42.7$ ;  $P < 6.3 \times 10^{-11}$ ), *Deltaproteobacteria* (Kruskal-Wallis  $X^2 = 66.7$ ;  $P < 3.2 \times 10^{-16}$ ) and *Gammaproteobacteria* (Kruskal-Wallis  $X^2 = 66.6$ ;  $P < 3.2 \times 10^{-16}$ ), whereas aboveground habitats were enriched for *Deinococcus-Thermus* (Kruskal-Wallis  $X^2 = 68.0$ ;  $P < 2.2 \times 10^{-16}$ ) and *Bacteroidetes* (Kruskal-Wallis  $X^2 = 59.1$ ;  $P < 1.5 \times 10^{-14}$ ).

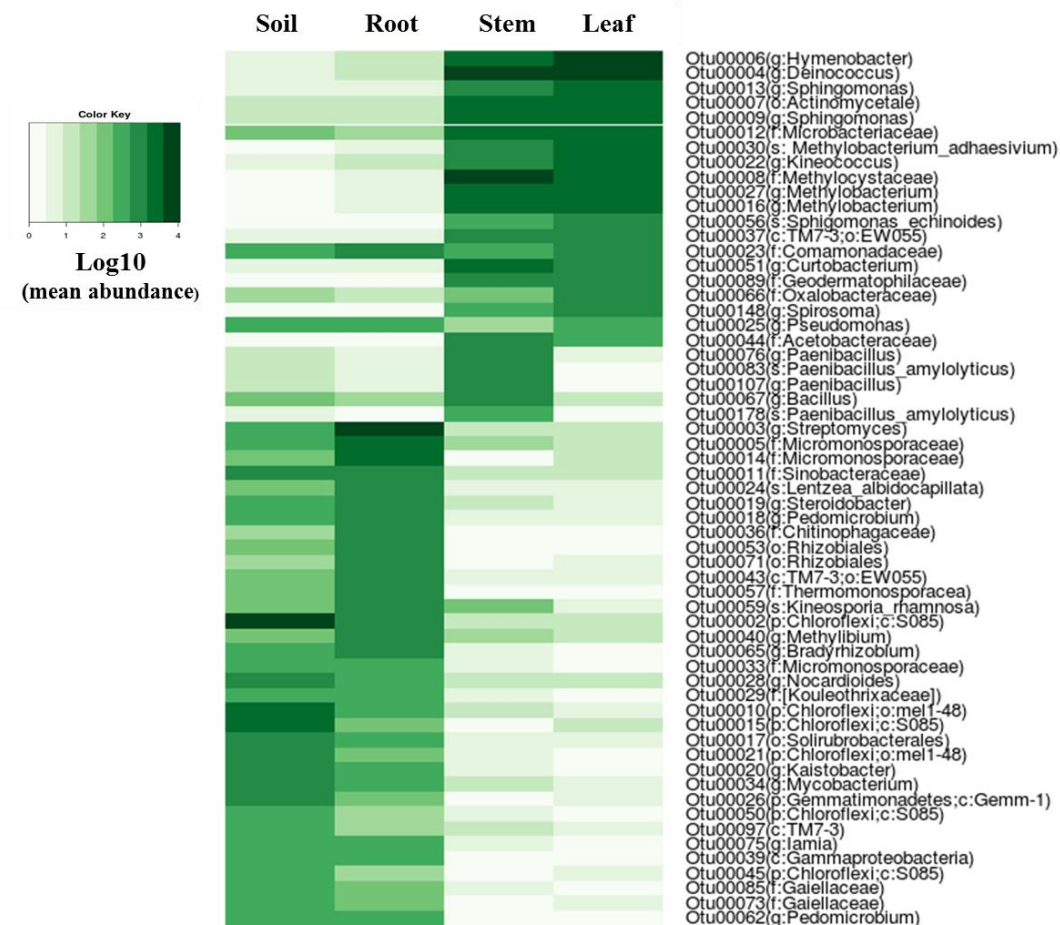




**Figure 2:** A barplot showing the bacterial community composition at the phylum or class level for each habitat (leaf, stem, root and soil) based on 16S rDNA sequencing of samples using the metabarcoding approach. The species of Hg-resistant strains isolated from belowground and aboveground habitats are indicated.

Although soil and root habitats were closely related to each other compared to aboveground habitats, both root and soil samples demonstrated also specificity in terms of the composition of their bacterial communities. The soil habitat was distinguished from the root habitat by a higher proportion of *Chloroflexi* (Kruskal-Wallis  $X^2 = 66.6$ ;  $P < 3.2 \times 10^{-16}$ ) and *Gemmatimonadetes* (Kruskal-Wallis  $X^2 = 34.6$ ;  $P < 4.1 \times 10^{-9}$ ) and lower *Actinobacteria* (Kruskal-Wallis  $X^2 = 33.1$ ;  $P < 8.6 \times 10^{-9}$ ). Additionally, soil was the only habitat containing bacteria from the phylum *Nitrospirae*. Bacterial communities inhabiting aboveground habitats were similar in both stem and leaf samples, although *Firmicutes* was only found in stems (8.5 %). A heatmap constructed with the most abundant OTUs in each of the 4 habitats (Fig. 3, 59 OTUs in total) indicated a net clustering between bacterial communities in belowground and aboveground habitats (Fig. 3). Moreover, the “multipatt” function of the “indicspecies” package identified the most specific OTUs for soil, root and phyllosphere habitats (Table S3). Among these 59 OTUs, only 4 were shared by all four habitats, exemplified by OTU00025 assigned to *Pseudomonas* and OTU00023 assigned to *Comamonadaceae*, with both OTUs comprising between 0.5 and 1.5 % of the relative abundance of each habitat. A total of 34 OTUs were specific to belowground samples, and 16 were specific to aboveground samples. Five OTUs, all from the phylum *Firmicutes*, were essentially found in the stem habitat, exemplified by OTU00083 assigned to *Paenibacillus amylolyticus*. Among the 16 OTUs shared by stem and

leaf communities, the most abundant were species from the genera *Hymenobacter*, *Deinococcus*, *Sphingomonas*, *Kineococcus* and *Methylobacterium*. Among the 34 OTUs shared in belowground habitats, several were more specific to the root habitat, such as *Streptomyces* (OTU00003) and *Micromonosporaceae* (OTU00005 and OTU00014). Indeed, *Streptomyces* was most specific to the root community, accounting for 24.4 % of the relative abundance, but represented only 0.8 % of the soil community. In contrast, OTUs affiliated to the *Chloroflexi* phylum were the most abundant in the soil community.



**Figure 3:** A heatmap comparing the abundance of bacterial OTUs among the 20 most abundant OTUs in at least one of the four poplar habitats. The dendrogram represents linkage clustering using Euclidean distance measures. OTU delineation was based on a cutoff of < 97 % sequence similarity. Assignments between brackets indicate the lower taxonomic level associated with the OTU using the Greengenes database, k: kingdom, p: phylum, o: order, c: class, f: family, s: genus and species.

### 3.2. Mercury resistance and functional traits of bacteria isolated from belowground and aboveground habitats

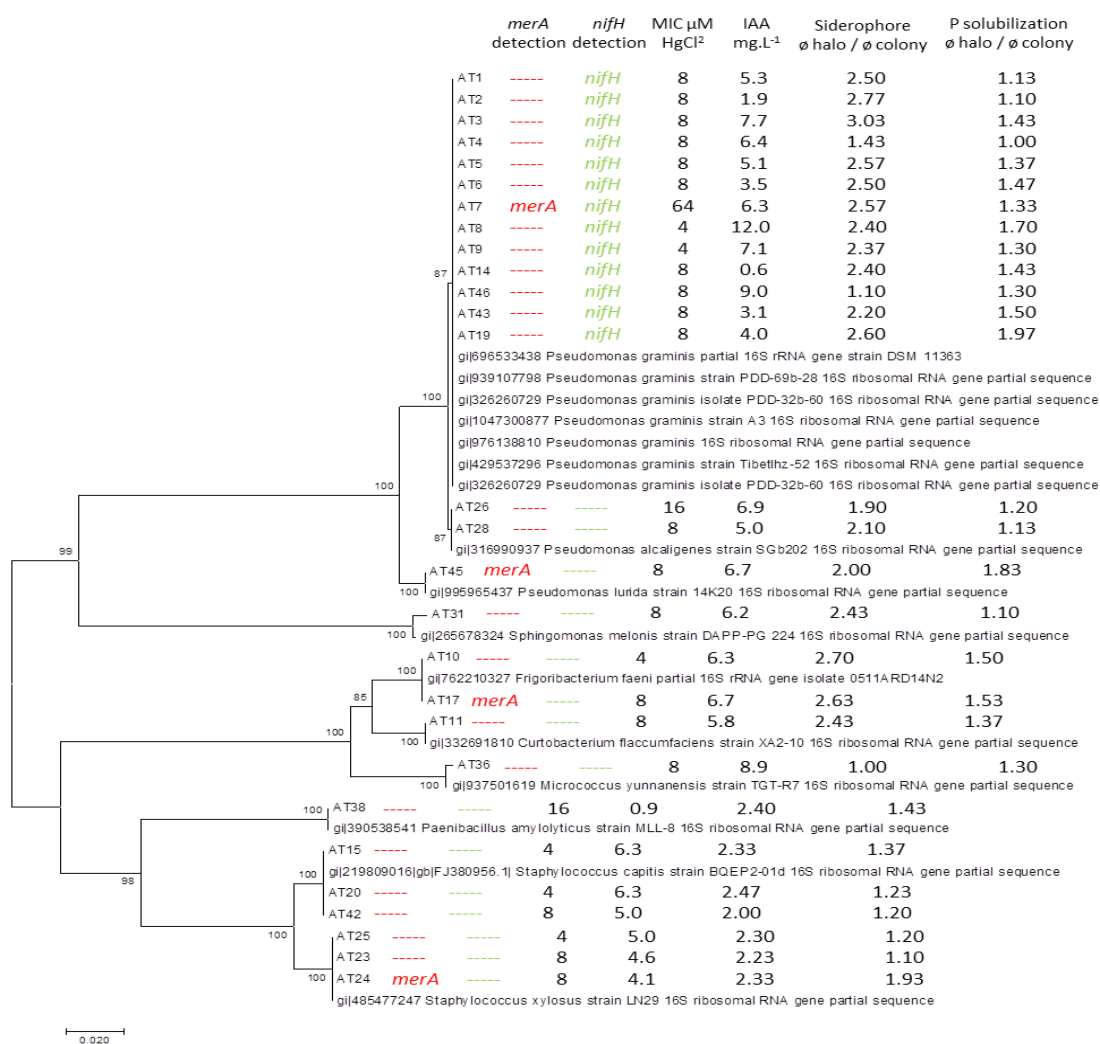
Table 2 shows the cultivability of bacteria from the four habitats and the cultivability of Hg-resistant bacteria. In the media without Hg, a higher number of CFUs were isolated in all habitats when using 1/10 869 medium compared to 284 medium, and followed this gradient: rhizospheric soil > buck soil > root endosphere > stem endosphere > leaf episphere

> stem episphere > leaf endosphere. The sizes of the cultivable microbial communities were compared to the sizes of communities exposed to 10  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  for all habitats. A decrease in all cultivable bacterial communities was observed after exposure to 10  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ . The bacteria living in the phyllosphere demonstrated low cultivability when exposed to 10  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}$  compared to bacteria from the belowground habitats. Hg-resistant bacteria were isolated from bulk soil, rhizospheric soil, epiphytic stem and epiphytic leaf samples, whereas no Hg-resistant endophytic bacteria were isolated. A few root endophytic bacteria were isolated initially but were not confirmed in subsequent steps. Among all habitats, the bulk soil hosted the highest densities of Hg-resistant bacteria (at 10  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ ).

**Table 2:** Colony forming units per gram dry weight soil (CFUs  $\text{g}^{-1}$ ) on solid media and percentage (%) of Hg-resistant cultivable bacteria to 2 and 10  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  in the different habitats.

Habitats		Medium 1/10 869			Medium 284	
		0 $\mu\text{M}$ $\text{Hg Cl}_2$	2 $\mu\text{M}$ $\text{Hg Cl}_2$	10 $\mu\text{M}$ $\text{Hg Cl}_2$	0 $\mu\text{M}$ $\text{Hg Cl}_2$	10 $\mu\text{M}$ $\text{Hg Cl}_2$
Aboveground	leaf episphere	3.59 105 (100%)	9.28 104 (25.86%)	2.43 104 (6.77%)	2.14 105 (100%)	2.85 104 (13.31%)
	stem episphere	5.38 104 (100%)	1.21 104 (22.45%)	3.56 103 (6.62%)	0	0
	leaf endosphere	2.24 104 (100%)	ND	0	0	0
	stem endosphere	1.71 106 (100%)	ND	0	0	0
Belowground	root endosphere	4.77 106 (100%)	ND	9.54 102 (0.02%)	1.45 106 (100%)	0
	rhizospheric soil	6.28 108 (100%)	ND	9.84 107 (10.89%)	2.01 108 (100%)	4.02 106 (2.00%)
	bulk soil	1.34 107 (100%)	ND	9.02 106 (67.33%)	8.20 106 (100%)	3.18 106 (38.78%)

The list of isolated Hg-resistant species in belowground and aboveground habitats is shown in Fig. 2. Phenotypic and genotypic characterizations were performed for the 56 identified Hg-resistant strains (34 isolated from aboveground habitats and 22 from belowground habitats) (Fig. 4 and Table S4). All strains were identified after BLAST analysis of 16S rDNA sequences, and NJ-phylogenetic trees were subsequently established. For example, in the phyllosphere we identified strains from the genera *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Frigoribacterium*, *Curobacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus* and *Staphylococcus* (Fig. 4). For those 56 identified strains, the Hg resistance of bacteria from belowground habitats was higher than that of bacteria from aboveground habitats (Table S4). Indeed, the strains found in aboveground habitats presented MIC values between 4 and 64  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  (Fig. 4), whereas the strains from belowground habitats exhibited MIC values between 16 and 254  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ . In bacteria from various habitats, the presence of the *merA* gene did not consistently correlate with their Hg MICs (Table S4). Surprisingly, the *nifH* gene was observed in all 13 aboveground *Pseudomonas graminis* strains (Fig. 4 and Table S4), and an experiment in semi-solid nitrogen-free medium confirmed the ability of these strains to fix  $\text{N}_2$ .



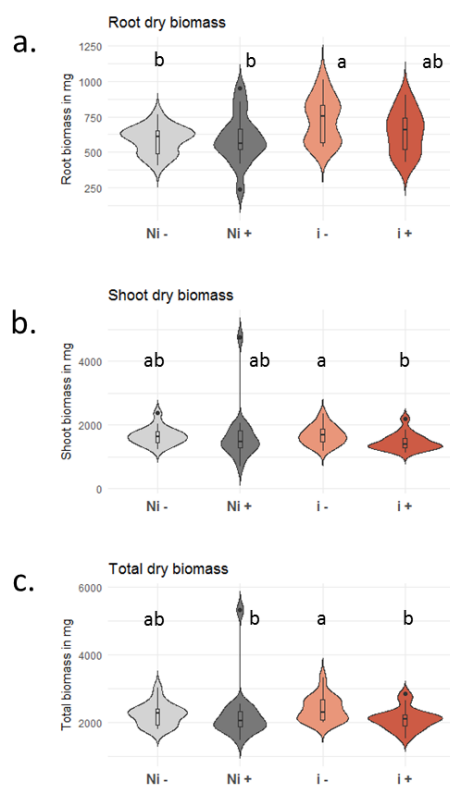
**Figure 4:** Phylogeny of the Hg-resistant bacteria isolated from the phyllosphere in 1/10 869 medium containing 2  $\mu$ M HgCl<sub>2</sub>. The phylogenetic tree was constructed using a K2P Neighbor-joining model based on aligned DNA sequences (697 bp) with 1,000 iterations. The parentage of branches is given in the tree. Phenotypic and genotypic characterizations for each strain are also shown.

In both aboveground and belowground habitats, all strains demonstrated IAA production, with variations in the amount of IAA produced (mg l<sup>-1</sup>) between strains. The lowest IAA producers were AT38 (*Paenibacillus amylolyticus*) in the phyllosphere (with 0.9 mg l<sup>-1</sup> IAA) and FT43 (*Pseudomonas fluorescens*) in the belowground samples (with 2.1 mg l<sup>-1</sup> IAA), while the best IAA producers in the phyllosphere were AT8 (*Pseudomonas graminis*), with 12 mg l<sup>-1</sup> IAA, and FT97 (*Bacillus subtilis*), with 12.5 mg l<sup>-1</sup> IAA (Table S4). In belowground habitats, all strains with the exception of ST81 (*Bacillus licheniformis*) showed siderophore activity, reported as the ratio of the diameter of the orange-colored zone compared to the diameter of the colony; ratios ranged from 1.8 to 4.8. For the belowground bacterial consortium, we selected strains with ratios higher than 3.0. In aboveground samples, 28 of the 34 colonies demonstrated siderophore production, with ratios ranged from 1.1 to 3.0. Phosphate solubilization ability (ratio > 1) was more frequently detected in aboveground bacteria (31 of

34 colonies) than in belowground bacteria (6 of 22 colonies) (Table S4). Finally, the strains with the best profiles in terms of Hg resistance and PGP potential were selected for inoculation (IAA > 4 mg l<sup>-1</sup> and siderophore ratio > 2.4, plus *nifH* detection, high Hg resistance, phosphate solubilization potential). The strains AT3, AT7, AT8 and AT9 were part of the consortium to inoculate the phyllosphere, and the strains FT79, FT82, FT97 and FT50 were part of the consortium to inoculate belowground.

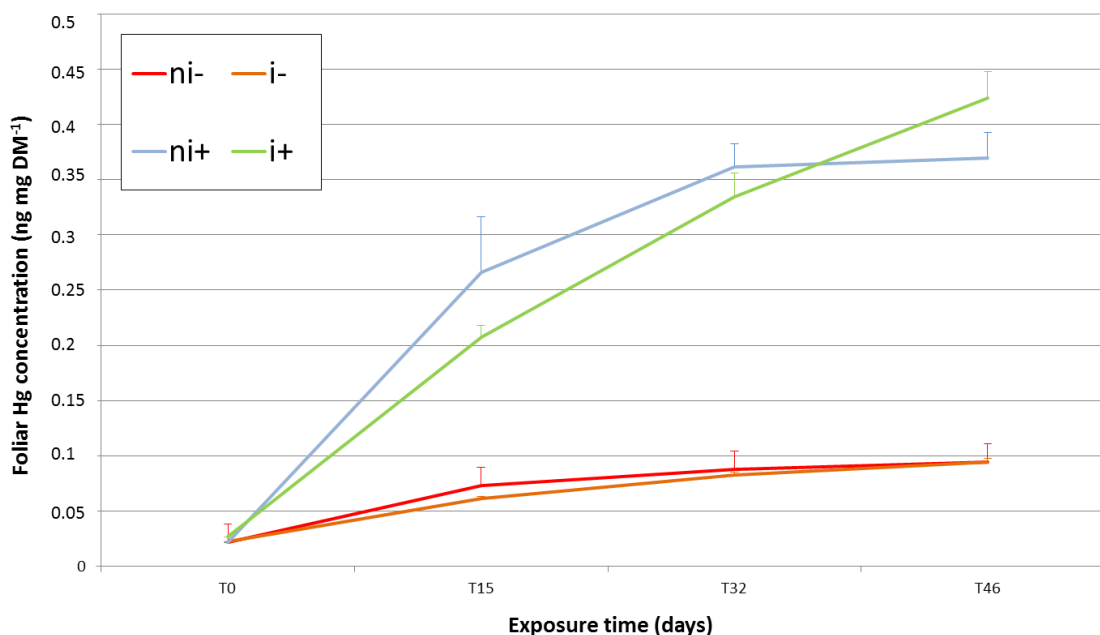
### 3.3. Influence of the Hg-resistant bacteria PGPB consortia on plant growth and Hg accumulation in pepper

The Hg-contaminated atmosphere significantly lowered the stem length in both inoculated and uninoculated pepper plants after 32 days compared to the non-contaminated atmosphere, but no differences were observed after 46 days of growth (data not shown) and at harvest, Hg had no impact on plant dry biomass. However, inoculation significantly increased the dry root biomass of Hg-unexposed plants (increase of 24%), and the same trend appeared for Hg-exposed plants (increase of 8%) (Fig. 5a). We did not observe significant differences between various treatments in terms of shoot and total dry biomasses (Fig. 5b and c).



**Figure 5:** Violin plot of the root, shoot and total dry biomasses at harvest (46-day mesocosms) for uninoculated and Hg-unexposed (ni-), uninoculated and Hg-exposed (ni+), inoculated and Hg-unexposed (i-) and inoculated and Hg-exposed (i+) plants. Different letters indicate significant differences, P value < 0.01.

Plants from Hg-enriched atmosphere chamber had significantly higher Hg concentrations in leaves at harvest (4 fold higher) than Hg-unexposed plants (Fig. 6).



**Figure 6:** Hg concentration (ng mg DM<sup>-1</sup>) in the dry biomass of older leaves of peppers grown for 46 days with the following treatments: uninoculated and Hg-unexposed (ni-), uninoculated and Hg-exposed (ni+), inoculated and Hg-unexposed (i-) and inoculated and Hg-exposed (i+). Different letters indicate significant differences, P value < 0.01.

However, inoculation with the selected bacterial consortia had no impact on Hg accumulation. Root Hg concentrations were below quantification limit (0.01 ng Hg) (data not shown). The metabolic activities estimated using Biolog Ecoplate™ microplates revealed that planted soils had higher metabolic activities than unplanted soils and no differences between Hg-exposed or Hg-unexposed pots were observed (Fig. S3). Among the 31 substrates tested, we observed significant differences for L-phenylalanine, which was metabolized to a greater degree by soil microorganisms of the inoculated plants compared to uninoculated plants.

## 4. Discussion

The experimental design provided us with the opportunity to characterize bacterial communities in 4 habitats (soil, root, stem and leaf) at a poplar tree plantation on a Hg-contaminated site using metabarcoding tools and traditional isolation-based techniques. Regarding the metabarcoding approach, at each habitat, the community was considered in its entirety, and no distinction was made between endophytes and epiphytes for the three plant habitats. In other studies where both compartments were analyzed separately a major overlap between the two bacterial communities was observed [54]. Notably, sampling was carried out

in mid-season (July-August), and we did not attempt to study the seasonal dynamics of our habitats. According to previous studies, the mid-season community in the phyllospheric habitat is more diverse and contains more unique species than the early (May-Jun) or late-season (September-October) communities [55].

Illumina-based sequencing of bacterial communities from plant habitats, such as roots, stems and leaves, was difficult due to unsuitable chloroplast DNA amplification. A similar study investigating oak phyllospheric bacterial communities using 16S amplification revealed higher proportions of oak chloroplast sequences than bacterial sequences, with the total sequence pool reaching up to 92.1 % chloroplast sequences [56] using a previously described amplification protocol [57]. Using a different protocol [26] with specific primers (799F-1115R) and optimized hybridization conditions (64°C), we still observed chloroplast DNA amplification for the stem and leaf habitats. However, the majority of amplified sequences were of bacterial origin, and the total pool of sequences (2,661,227 effective sequences) was consistent with high Good's coverage and satisfactory taxonomical assignment. In our study, Illumina MiSeq sequencing allowed us to obtain a greater number of reads per sample, and the alpha diversity indices were comparable to those found in a previous study (Beckers et al., 2017).

Analysis of our datasets revealed that bacterial communities were habitat-specific. Moreover, aboveground and belowground habitats were clearly different between them, as shown in figure 3. Similar results were also found by Knief et al. (2012) in rice. These authors found that rice rhizosphere hosts a bacterial community that is distinct to that in the phyllosphere regarding composition and complexity [58]. The aboveground and belowground communities shared few OTUs, and the aboveground communities were less enriched and diverse than the belowground communities. Similarly, a recent study carried out on seven tree species revealed lower alpha diversity in aboveground habitats compared to belowground habitats, which is consistent with our results [59]. On the other side, this results seems to be plant species-specific since Coleman-Derr et al., (2015) have found that the phyllosphere of the agave plant hosts a diversity of prokaryotes, comparable to the rhizosphere [54].

The soil and root habitats shared approximately half of their OTUs, which was lower than the proportions previously observed for *Arabis alpina* (> 64 % for the soil, rhizosphere and root communities) [60]. However, evidence of a lower alpha diversity in the roots compared to the soil was highlighted in our results. The dataset obtained for root and soil samples in this study corroborates our previous study, which was carried out at the same site on native tree species (poplar and willow), revealing the dominance of *Proteobacteria* and *Actinobacteria*

(Zappelini et al., 2015). The dominance of the phylum *Chloroflexi* in soil samples from the present study may be explained by the adaptability of members of this phylum to oligotrophic environments [61] and is dominant in TE-contaminated soil, suggesting that this phylum is abundant in extreme conditions [62].

The root habitat was significantly enriched for spore-forming bacteria, such as those from the genus *Streptomyces*, compared with the other three habitats, a feature that was observed in several studies performed on contaminated soils [63–65]. The predominance of these spore-forming bacteria on or inside the roots could be explained by the fact that the abundance of r-strategists (bacteria capable of rapid growth and utilization of resources) decreases in the root area in disturbed soils (such as metal-contaminated soils), while k-strategists (bacteria with reduced growth and metabolic activity) such as *Streptomyces* may be privileged [66]. In addition, the *Streptomyces* genus contains many strains that are highly resistant to several metals [67] and thus may be more competitive than other bacteria in TE-enriched environments such as the tailings dump of Tavaux.

In the leaf and stem habitats, OTUs from the phylum *Deinococcus-Thermus*, such as those from the genus *Deinococcus* (Figs. 2 & 3), were among the most abundant OTUs and were not detected in either the soil or root habitats. This group of bacteria consists of polyextremophile bacteria that are resistant to very high doses of radiation and long periods of desiccation [68]. The genus *Methylobacterium* was also identified in the phyllosphere of the plantation; this genus constitutes a considerable and generally stable fraction of the phyllospheric bacterial communities of terrestrial plants under varying environmental conditions [69]. The other taxa that were most characteristic of the phyllosphere habitats belonged to the genera *Hymenobacter* and *Sphingomonas*. Members of these bacterial genera were previously identified as more characteristic of the urban ivy (*Hedera helix*) phyllosphere than that of non-urban ivy [70]. Atmospheric contamination may promote the growth of these specific taxa to a greater degree than other taxa.

Our study is one of the first to compare bacterial communities of leaf and stem habitats in trees using Illumina-based MiSeq sequencing; thus, little data is available in the literature for comparison. Both habitats clustered closely together (Table S2), but the stem appeared to be significantly less diverse than the leaf. The stem appeared to host a number of specific bacteria that were not detected in the leaf habitat. Indeed, *Firmicutes* were essentially only detected in the stem samples, not the leaf samples, and the genus *Paenibacillus* was the dominant member of this phylum. An abundance of this genus in the stem was previously observed for endophytes isolated from *Populus* cv. Hazendans but not for endophytes isolated from *Populus* cv.



Hoogvorst [71]. Several dominant bacterial OTUs in the stem group were assigned to *Paenibacillus amylolyticus* (Table S3). Some environmental or physiological specific factors associated with the stem are likely responsible for the presence of this bacterium. This species was previously identified in the bract phyllosphere of the plant *Phoenix dactylifera*, which dries out and remains on the plant [72]. Other studies investigating the rhizosphere [73] or the phyllosphere [74] revealed that most of the plant polysaccharide-degrading bacteria isolated from plant habitats belong to the *Paenibacillus* genus. These bacteria readily digest polysaccharides, such as cellulose, pectin, starch, esculin and xylan. Moreover, we tested our phyllospheric-isolated strains for pectinase and cellulase activities using previously described protocols [75] and observed that the isolated *Paenibacillus amylolyticus* strain was positive for pectinase activity and negative for cellulase activity (data not shown). Based on these results, tissues of terrestrial plants represent various habitats that host specific microbial communities. It may be interesting to decipher the structure and composition of these communities using both DNA sequencing and culture-dependent methods, each of which have constraints and advantages.

We further assessed the cultivability of the bacteria isolated from various habitats of the poplar tree plantation when Hg was added as a stressor. The bacterial communities from the phyllospheric habitats were altogether less resistant than the communities hosted in the belowground habitats, potentially due to the direct contact between soil bacterial communities and high loads of Hg within the soil. The rhizospheric soil hosted a bacterial community that was richer than that of the bulk soil, which was expected. Indeed, previous works have shown that planted soils host significantly richer bacterial communities compared to unplanted soils [39]. This is explained by the presence of plant exudates in the soil surrounding the roots, which play a role in bacterial growth [76]. However, bacteria isolated from the bulk soil were more resistant to Hg than bacteria isolated from the rhizospheric soil. We isolated Hg-resistant strains harboring PGP traits, such as isolates of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas* sp. from each habitat. The species *Bacillus subtilis* is known for its antifungal properties, siderophores, IAA production and biocontrol effects on Fusarium wilt (Zaidi et al. 2006; Chebotar' et al. 2009). This species was previously tested as a bioinoculant to improve Ni bioaccumulation by *Brassica juncea* and promoted the growth of pepper plants [78]. Many plant-associated *Pseudomonas* species directly and indirectly promote plant growth, a phenomenon that has previously been reviewed [80]. These species compete with and suppress pathogenic microorganisms to promote plant growth.

In endophytic habitats, our results regarding root and stems habitats were comparable with previous data from *Trifolium pretense* [81]; however, density of leaf endophytic cultivable bacteria was lower in our study. The epispheric habitat of the stem exhibited a lower cultivable bacterial community than the endospheric habitat, whereas the leaf episphere hosted more cultivable bacteria than its endosphere. The structures of these plant organs may be correlated with these results. In this study, several *Pseudomonas* sp. (including *P. graminis*) were isolated from the phyllosphere of poplar in the Hg-enriched growth medium. The presence of this genus was also observed using the metabarcoding technique essentially with the OUT00025 (Fig. 3 and Table S3), which were mostly detected in the leaf (0.96 %), the root (0.66 %) and soil (0.73 %) habitats. *Pseudomonas* are ubiquitous bacteria that survive on plant surfaces and inside plant tissues in both aboveground and belowground habitats [82]. Specifically, *Pseudomonas graminis* is found in phyllospheric habitats [83] and was previously isolated from poplar [17]. However, this strain was previously defined as an endophyte and was unable to grow in N-free media [84]. We observed the presence of the *nifH* gene in all *Pseudomonas graminis* strains, and we confirmed that these strains were able to reduce atmospheric N<sub>2</sub> in nitrogen-free medium. A previous study showed that a *Pseudomonas graminis* strain isolated from poplar and re-inoculated on sterile *Populus trichocarpa* as part of a microbial consortium promoted root production, improved total biomass production and increased leaf area [85]. In addition, inoculation resulted in a 25 % increase in the total nitrogen content. The presence of high Hg resistance and the potential to fix atmospheric N<sub>2</sub> such as the *Pseudomonas graminis* strains identified in this study might be valuable traits to further investigate in a future study and may therefore be key microorganisms for the restoration of disturbed environments. We were unable to isolate endophytic Hg resistant bacteria from any of the three habitats tested, suggesting the internal plant tissues may not host resistant bacteria.

As previously reviewed, the microbial communities of the phyllosphere have a central role in plant function and atmospheric trace gas dynamics [10]. Thus, using PGPB inoculation in both the rhizosphere and phyllosphere, we sought to improve the uptake of Hg by a Hg-accumulating plant, specifically, pepper. However, our results revealed that inoculation did not affect the rate of Hg accumulation in pepper leaves, although it did increase root growth. This growth may be related to a significant increase in the metabolism of L-phenylalanine by microbial communities of the inoculated plants. Indeed, the increased activity of phenylalanine ammonia-lyase in *Bacillus subtilis* leads to the release of ammonia into the soil, which then acts as a fertilizer [86].

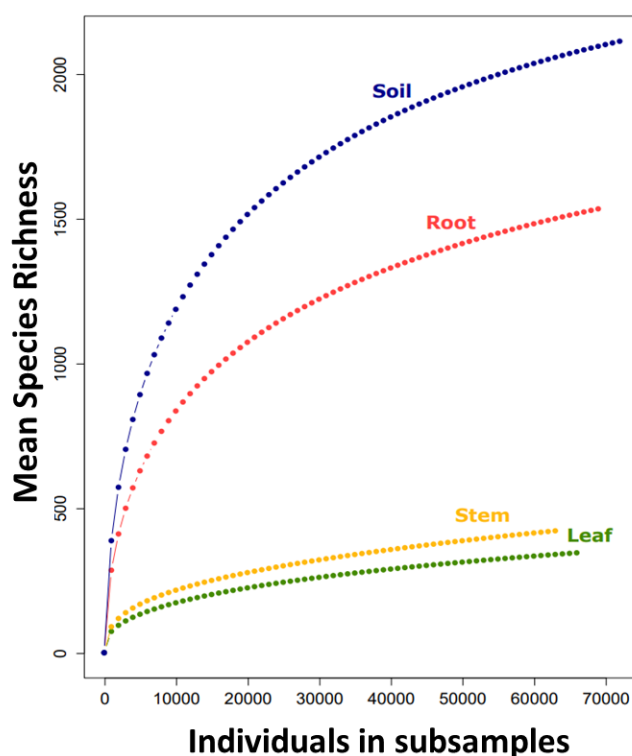
In conclusion, the application of a metabarcoding approach to the study of bacterial communities associated to the poplar cultivar Skado (*P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*) planted at an industrial phytomanaged site revealed contrasting microbial communities in different poplar habitats. In parallel, a more conventional approach allowed us to isolate strains with functional traits of interest. We believe that the present findings will be instructive for the design of future restoration practices for industrial dumps.

## **Acknowledgments**

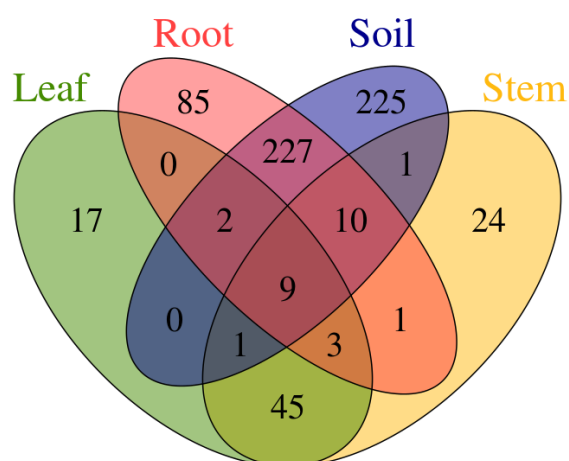
This work was supported by the French Environment and Energy Management Agency [PROLIPHYT 1172C0053], the Région Franche-Comté [Environnement-Homme-Territoire 2014-069], the Pays de Montbéliard Agglomération [13/070-203-2015], and the French national programme EC2CO/MicrobiEen FREIDI-Hg. A.D. received a PhD grant from the Région Franche-Comté. V.A.L. received a post-doc grant from the Région Franche-Comté.

## Supporting Informations

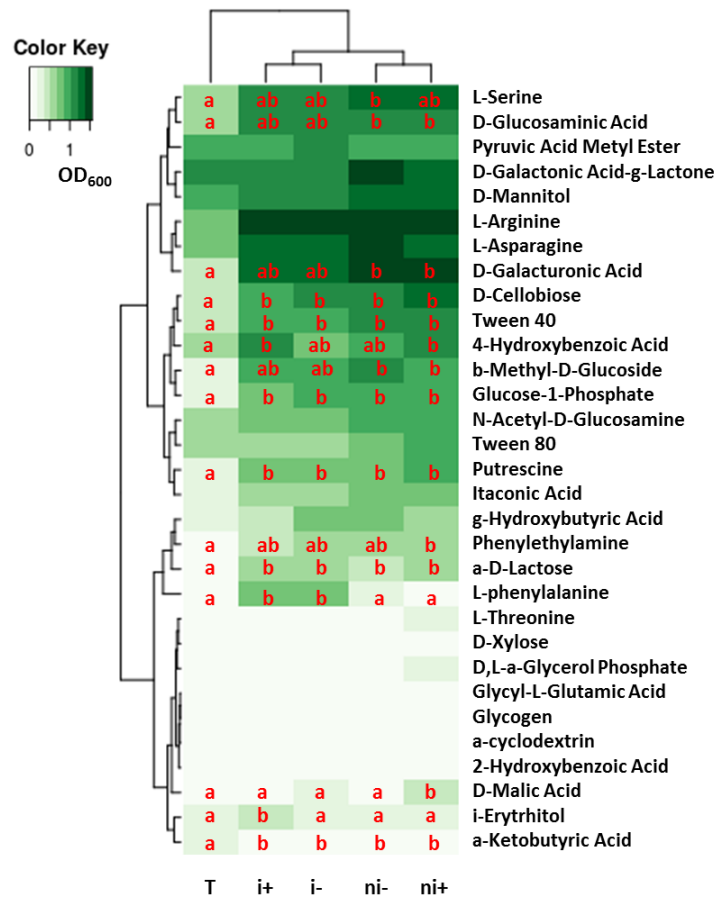
The following Supporting Information is available for this article:



**Figure S1.** Rarefaction analysis of 16S V5V6 region (799f-115r) sequences data for estimating bacterial diversity of the four habitats (leaf, stem, root and soil) based on a cutoff < 97% sequence similarity for the delineation of operational taxonomic units (OTUs).



**Figure S2.** Venn diagram showing the shared and unique operational taxonomic units (OTUs) among the four habitats: leaf (green), stem (yellow), root (red) and soil (blue). OTUs delineation was based on a cutoff < 97 % 16S rDNA sequence similarity.



**Figure S3.** A HeatMap showing the OD600 measured for the 31 carbon substrates after 48h of incubation at 25 °C of the bacterial community from peat with no vegetal cover (T), uninoculated and Hg-unexposed (ni-), uninoculated and Hg-exposed (ni+), inoculated and Hg-unexposed (i-) and inoculated and Hg-exposed (i+). Different letters indicate significant differences, P value < 0.01.

**Table S1.** Description of the metabarcoding datasets. Numbers under brackets are the percentage of total effectives sequences assigned at each taxonomic level. The Good's coverage is an estimator of completeness of sampling.

Habitats	Number of discarded plant sequences	Effectives sequences	Phylum assigned sequences	Class assigned sequences	Order assigned sequences	Family assigned sequences	Genus assigned sequences	Good's Coverage
Combined dataset	535,092	2,661,227 (100 %)	2,571,925 (96.6 %)	2,592,742 (97.4 %)	2,283,758 (85.8 %)	1,796,392 (67.5 %)	1,075,866 (40.4 %)	95.1
Soil	519	1,045,030 (100 %)	1,010,995 (96.7 %)	994,915 (95.2 %)	739,268 (70.7 %)	492,520 (47.1 %)	239,568 (22.9 %)	89.3
Root	5,483	822,022 (100 %)	812,783 (99.3 %)	806,280 (98.1 %)	755,502 (91.9 %)	605,355 (73.6 %)	311,865 (37.9 %)	93.1
Stem	288,539	428,700 (100 %)	428,628 (99.9 %)	426,975 (99.6 %)	426,469 (99.5 %)	375,015 (87.5 %)	273,011 (63.7 %)	98.9
Leaf	240,551	319,567 (100 %)	319,519 (99.9 %)	318,973 (99.8 %)	318,531 (99.7 %)	286,830 (89.8 %)	226,302 (70.8 %)	99.1

**Table S2.** ANOSIM analyses of the bacterial communities associated to the four poplar habitats

and their interactions. An ANOSIM  $r^2$  value of 1 indicates complete dissimilarity between groups.

Habitats	$r^2$	p-value
Soil:Root:Stem:Soil	0.94	0.001
Soil:Root:Stem	0.98	0.001
Soil:Root:Leaf	1	0.001
Soil:Stem:Leaf	0.90	0.001
Root:Stem:Leaf	0.87	0.001
Soil:Root	1	0.001
Soil:Stem	1	0.001
Soil:Leaf	1	0.001
Root:Stem	1	0.001
Root:Leaf	1	0.001
Stem:Leaf	0.61	0.001

**Table S3.** Relative abundance of the 20 most abundant OTUs in at least one of the four poplar habitats. The bioindication capacity of each OTUs was determined using multipatt” function of the indicpecies” package ; thus, a  $r^2$  close to 1 indicates a high specificity to the habitat tested. Only significant  $r^2$  are showed (p value < 0.001).

OTU number (best taxonomi assignement)	Relative abundance in each habitats				Statistical analysis (p-value < 0.001)	
	Soil	Root	Stem	Leaf	Bioindicator of the habitat(s):	$r^2$
Otu00006(g:Hymenobacter)	0.006	0.020	8.592	17.291	stem/leaf	1
Otu00004(g:Deinococcus)	0.008	0.025	14.297	9.483	stem/leaf	0.999
Otu00013(g:Sphingomonas)	0.004	0.004	1.379	7.514	stem/leaf	1
Otu00007(o:Actinomycetale)	0.015	0.016	8.575	6.461	stem/leaf	0.999
Otu00009(g:Sphingomonas)	0.017	0.020	3.805	6.456	stem/leaf	0.998
Otu00012(f:Microbacteriaceae)	0.186	0.100	3.900	5.445	soil/root/leaf	0.995
Otu00030(s: Methylobacterium adhaesivium)	0.003	0.012	2.081	4.935	stem/leaf	0.999
Otu00022(g:Kineococcus)	0.006	0.014	3.041	3.832	stem/leaf	0.998
Otu00008(f:Methylocystaceae)	0.003	0.007	11.537	3.780	stem/leaf	1
Otu00027(g:Methylobacterium)	0.003	0.009	3.194	3.656	stem/leaf	0.999
Otu00016(g:Methylobacterium)	0.003	0.007	4.443	3.388	stem/leaf	0.999
Otu00056(s:Sphigomonas echinoides)	0.001	0.003	0.786	2.665	stem/leaf	1
Otu00037(c:TM7-3;o:EW055)	0.004	0.006	2.824	2.520	stem/leaf	0.999
Otu00023(f:Comamonadaceae)	0.521	0.987	0.651	1.559	-	
Otu00051(g:Curto bacterium)	0.006	0.006	3.198	1.448	stem/leaf	0.999
Otu00089(f:Geodermatophilaceae)	0.001	0.001	1.065	1.432	stem/leaf	0.976
Otu00066(f:Oxalobacteraceae)	0.036	0.023	0.319	1.330	stem/leaf	0.971
Otu00148(g:Spirosoma)	0.001	0.001	0.675	1.118	stem/leaf	0.976
Otu00025(g:Pseudomonas)	0.658	0.732	0.073	0.958	soil/root/leaf	0.985
Otu00044(f:Acetobacteraceae)	0.001	0.001	2.829	0.942	stem/leaf	1
Otu00076(g:Paenibacillus)	0.021	0.009	2.425	0.006	-	
Otu00083(s:Paenibacillus amyloviticus)	0.014	0.007	2.219	0.002	-	
Otu00107(g:Paenibacillus)	0.013	0.004	1.456	0.002	-	
Otu00067(g:Bacillus)	0.249	0.041	1.317	0.017	root/leaf	0.914
Otu00178(s:Paenibacillus amyloviticus)	0.004	0.001	0.957	0.002	-	
Otu00003(g:Streptomyces)	0.863	24.410	0.032	0.038	root	0.979
Otu00005(f:Micromonosporaceae)	0.475	7.378	0.054	0.023	soil/root	0.995
Otu00014(f:Micromonosporaceae)	0.222	3.436	0.002	0.014	soil/root	0.987
Otu00011(f:Sinobacteraceae)	1.368	2.778	0.021	0.015	soil/root	0.996
Otu00024(s:Lentzea albidocapillata)	0.243	2.575	0.010	0.008	soil/root	0.997
Otu00019(g:Steroidobacter)	0.464	2.268	0.040	0.006	soil/root	0.992
Otu00018(g:Pedomicrobium)	0.639	2.257	0.005	0.011	soil/root	0.997
Otu00036(f:Chitinophagaceae)	0.071	1.942	0.002	0.003	root	0.981
Otu00053(o:Rhizobiales)	0.119	1.835	0.002	0.002	root	0.969
Otu00071(o:Rhizobiales)	0.060	1.733	0.002	0.005	root	0.982
Otu00043(c:TM7-3;o:EW055)	0.133	1.523	0.005	0.009	soil/root	0.964
Otu00057(f:Thermomonosporaceae)	0.128	1.455	0.002	0.003	soil/root	0.988
Otu00059(s:Kineosporia rhamnosa)	0.117	1.210	0.125	0.006	root	0.912
Otu00002(p:Chloroflexi;c:S085)	8.690	1.201	0.033	0.026	soil/root	0.997
Otu00040(g:Methylibium)	0.197	1.183	0.083	0.036	soil/root	0.960
Otu00065(g:Bradvrhizobium)	0.488	1.035	0.010	0.002	soil/root	0.996
Otu00033(f:Micromonosporaceae)	0.510	0.887	0.010	0.003	soil/root	0.996
Otu00028(g:Nocardioides)	1.099	0.788	0.027	0.015	soil/root	0.989
Otu00029(f:[Kouleothrixaceae])	0.511	0.775	0.005	0.002	soil/root	0.998
Otu00010(p:Chloroflexi;o:mel1-48)	3.096	0.542	0.014	0.006	soil/root	0.997
Otu00015(p:Chloroflexi;c:S085)	2.971	0.312	0.002	0.015	soil/root	0.997
Otu00017(o:Solirubrobacterales)	1.908	0.620	0.006	0.008	soil/root	0.997
Otu00021(p:Chloroflexi;o:mel1-48)	1.842	0.178	0.006	0.002	soil/root	0.998
otu00020(g:Kaistobacter)	1.306	0.345	0.008	0.003	soil/root	0.997
Otu00034(g:Mycobacterium)	1.200	0.497	0.029	0.008	soil/root	0.990
Otu00026(p:Gemmatimonadetes;c:Gemm-1)	1.160	0.213	0.003	0.012	soil/root	0.994
Otu00050(p:Chloroflexi;c:S085)	0.913	0.054	0.006	0.002	soil	0.968
Otu00097(c:TM7-3)	0.900	0.048	0.021	0.009	soil	0.960
Otu00075(g:Iamia)	0.882	0.351	0.013	0.002	soil/root	0.995
Otu00039(c:Gammaproteobacteria)	0.819	0.477	0.002	0.003	soil/root	0.998
Otu00045(p:Chloroflexi;c:S085)	0.881	0.039	0.003	0.009	soil	0.967
Otu00085(f:Gaiellaceae)	0.667	0.126	0.010	0.003	soil/root	0.949
Otu00073(f:Gaiellaceae)	0.651	0.113	0.003	0.005	soil/root	0.963
Otu00062(g:Pedomicrobium)	0.647	0.601	0.002	0.003	soil/root	0.998

**Table S4.** Functional characteristics of isolated strains from belowground and aboveground habitats. For merA and nifH, “+” means positive detection and “-” negative detection of the gene in the strain. Light green strains were selected for the phyllospheric consortium, and dark green for the rhizospheric consortium to inoculate pepper. Ratio between colony diameter and halo diameter to determined siderophore production (Sid. ratio) and phosphate solubilization (PO<sub>4</sub> ratio) were calculated.

Habitats	Strain code	Mercury <sup>+</sup> /isolatome-dium	MIC HgCl <sub>2</sub> (µM)	merA	nifH	LA mg l <sup>-1</sup>	Sid. ratio	PO <sub>4</sub> -ratio	Species	
Aboveground habitats	Leaf episphere	AT1	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	-	+	5.2	2.3	1.1	<i>Pseudomonas graminis</i>
		AT2	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	-	+	1.9	2.8	1.1	<i>Pseudomonas graminis</i>
		AT3	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	-	+	7.7	3.0	1.4	<i>Pseudomonas graminis</i>
		AT4	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	4	-	+	6.4	1.4	1.0	<i>Pseudomonas graminis</i>
		AT5	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	-	+	5.1	2.6	1.4	<i>Pseudomonas graminis</i>
		AT6	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	-	+	3.4	2.5	1.5	<i>Pseudomonas graminis</i>
		AT7	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	64	+	+	6.3	2.6	1.3	<i>Pseudomonas graminis</i>
		AT8	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	4	-	+	12.0	2.4	1.7	<i>Pseudomonas graminis</i>
		AT9	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	4	-	+	7.1	2.4	1.3	<i>Pseudomonas graminis</i>
		AT10	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	4	-	-	6.3	2.7	1.5	<i>Fraxibacterium faeni</i>
		AT11	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	16	-	-	5.8	2.4	1.4	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>
		AT14	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	-	+	1.6	2.4	1.4	<i>Pseudomonas graminis</i>
		AT15	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	4	-	-	6.3	2.3	1.6	<i>Staphylococcus carnis</i>
		AT17	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	-	+	6.7	2.6	1.5	<i>Fraxibacterium faeni</i>
		AT19	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	4	-	+	4.0	2.6	2.0	<i>Fraxibacterium faeni</i>
	AT20	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	4	-	-	5.7	2.5	1.2	<i>Pseudomonas graminis</i>	
	AT23	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	-	-	4.6	2.2	1.1	<i>Staphylococcus carnis</i>	
	AT24	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	+	-	4.1	2.3	1.9	<i>Staphylococcus xylosum</i>	
	AT25	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	-	-	5.0	2.3	1.2	<i>Staphylococcus xylosum</i>	
	AT26	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	16	-	-	6.9	1.9	1.2	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	
	AT28	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	-	-	5.0	2.1	1.1	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	
	AT31	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	-	-	6.2	2.4	1.1	<i>Sphingomonas melonis</i>	
	AT36	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	32	-	-	6.6	1.0	1.0	<i>Athrobacter sclerotensis</i>	
	AT30	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	32	-	-	2.4	1.0	1.0	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	
	FT31	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	32	-	-	3.6	1.0	1.4	<i>Erwinia pectinifera</i>	
	FT33	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	32	-	-	3.6	1.9	1.9	<i>Erwinia thapsophila</i>	
	FT35	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	32	-	-	3.4	1.0	1.4	<i>Eubacterium sp.</i>	
	AT36	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	-	-	8.9	1.0	1.3	<i>Micrococcus vitruvianus</i>	
	AT38	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	16	-	-	0.9	2.4	1.4	<i>Paenibacillus amyloliquefaciens</i>	
	AT42	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	-	-	5.0	2.0	1.2	<i>Staphylococcus carnis</i>	
	AT43	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	-	+	3.1	2.2	1.5	<i>Pseudomonas graminis</i>	
	AT45	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	+	-	6.7	2.0	1.8	<i>Pseudomonas lutea</i>	
	AT46	869 + 2 µM HgCl <sub>2</sub>	8	-	+	9.0	1.1	1.3	<i>Pseudomonas graminis</i>	
FT18	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	32	-	-	5.2	1.0	1.3	<i>Erwinia aphidicola</i>		
FT9	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	32	-	-	4.4	2.7	1.0	<i>Pseudomonas sp.</i>		
FT80	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	>256	-	-	4.1	2.7	1.0	<i>Pseudomonas münzingeri</i>		
FT81	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	64	+	-	4.7	1.0	1.0	<i>Bacillus kielbasensis</i>		
FT82	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	64	+	-	3.8	3.0	1.0	<i>Pseudomonas sp.</i>		
FT87	284 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	64	+	-	3.3	3.1	1.0	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
FT88	284 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	64	+	-	3.3	3.0	1.0	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
FT90	284 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	16	+	-	3.8	2.9	1.0	<i>Pseudomonas putida</i>		
FT95	284 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	64	+	-	6.0	2.7	1.0	<i>Varovora sp.</i>		
FT97	284 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	>256	-	-	12.5	3.0	1.0	<i>Pseudomonas varcovitensis</i>		
FT10	284 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	64	-	-	5.7	4.8	1.0	<i>Bacillus subtilis</i>		
FT16	284 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	32	-	-	5.5	3.4	1.3	<i>Pseudomonas sp.</i>		
FT42	284 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	16	+	-	3.6	2.7	1.0	<i>Bacillus pumilus</i>		
FT43	284 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	64	+	-	2.1	3.2	1.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
FT44	284 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	32	+	-	5.3	3.0	1.0	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
FT30	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	128	+	-	6.8	3.4	1.0	<i>Erwinia sp.</i>		
FT38	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	>256	+	-	3.1	3.0	1.9	<i>Bacillus subtilis</i>		
FT60	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	64	+	-	4.2	2.4	2.1	<i>Pseudomonas varcovitensis</i>		
FT62	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	64	+	-	4.8	3.1	1.0	<i>Pseudomonas varcovitensis</i>		
FT67	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	256	+	-	6.3	1.8	1.4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
FT68	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	64	+	-	5.8	3.1	1.0	<i>Pseudomonas varcovitensis</i>		
FT73	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	64	-	-	4.0	2.5	1.0	<i>Sphingomonas sp. Ca6</i>		
FT78	869 + 10 µM HgCl <sub>2</sub>	128	+	-	8.9	3.4	1.1	<i>Pseudomonas varcovitensis</i>		



## Reference

1. Panagos P, Hiederer R, Van Liedekerke M, Bampa F (2013) Review Article Contaminated Sites in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network. *J Environ Public Health* Article ID:1–11. doi: DOI 10.1016/j.ecolind.2012.07.020
2. Toth G, Hermann T, Da Silva MR, Montanarella L (2016) Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environ Int* 88:299–309. doi: 10.1016/j.envint.2015.12.017
3. Partida-Martínez LP, Heil M (2011) The microbe-free plant: fact or artifact? *Front Plant Sci* 2:100. doi: 10.3389/fpls.2011.00100
4. Pieterse CMJ, de Jonge R, Berendsen RL (2016) The Soil-Borne Supremacy. *Trends Plant Sci* 21:171–173. doi: 10.1016/j.tplants.2016.01.018
5. Lindow SE, Brandl MT (2003) MINIREVIEW Microbiology of the Phyllosphere. *Appl Environ Microbiol*. doi: 10.1128/AEM.69.4.1875
6. Glick BR (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res* 169:30–39. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.009
7. Maignien L, DeForce E a., Chafee ME, et al (2014) Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities. *MBio* 5:1–10. doi: 10.1128/mBio.00682-13
8. Vorholt JA (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* 10:828–40. doi: 10.1038/nrmicro2910
9. Trouvelot S, HÃ©loir M-C, Poinssot B, et al (2014) Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Front Plant Sci* 5:1–14. doi: 10.3389/fpls.2014.00592
10. Bringel F, Couée I (2015) Pivotal roles of phyllosphere microorganisms at the interface between plant functioning and atmospheric trace gas dynamics. *Front Microbiol* 6:1–14. doi: 10.3389/fmicb.2015.00486
11. Glick BR (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett* 251:1–7. doi: 10.1016/j.femsle.2005.07.030
12. Vessey J (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 571–586.
13. Kloepper J, Lifshitz R, Zablotowicz R (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol*.
14. Glick B, Patten C, Holguin G, Penrose D (1999) Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press
15. Hallmann J, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 914:895–914.
16. Compant S, Clément C, Sessitsch A (2009) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42:669–678. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.11.024
17. Doty SL, Oakley B, Xin G, et al (2009) Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow. *Symbiosis* 47:23–33. doi: 10.1007/BF03179967
18. De Meyer SE, De Beuf K, Vekeman B, Willems A (2015) A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biol Biochem* 83:1–11. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.01.002
19. Wang D, Yang S, Tang F, Zhu H (2012) Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cell Microbiol* 14:334–342. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x
20. Gal M, Preston GM, Massey RC, et al (2003) Genes encoding a cellulosic polymer contribute toward the ecological success of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on plant surfaces. *Mol Ecol* 12:3109–3121. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01953.x
21. Vacher C, Hampe A, Porté A, et al (2016) The phyllosphere: microbial jungle at the plant-climate interface. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 47:1–24. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-121415-032238
22. Schmidt P-A, Bálint M, Greshake B, et al (2013) Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil*

- Biol Biochem 65:128–132. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.05.014
23. Wu Z, Hao Z, Zeng Y, et al (2015) Molecular characterization of microbial communities in the rhizosphere soils and roots of diseased and healthy *Panax notoginseng*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 108:1059–1074. doi: 10.1007/s10482-015-0560-x
  24. Zappellini C, Karimi B, Foulon J, et al (2015) Diversity and complexity of microbial communities from a chlor-alkali tailings dump. *Soil Biol Biochem* 90:101–110. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.08.008
  25. Durand A, Maillard F, Foulon J, et al (2017) Environmental Metabarcoding Reveals Contrasting Belowground and Aboveground Fungal Communities from Poplar at a Hg Phytomanagement Site. *Microb Ecol*. doi: 10.1007/s00248-017-0984-0
  26. Kembel SW, O'Connor TK, Arnold HK, et al (2014) Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *Proc Natl Acad Sci* 111:13715–13720. doi: 10.1073/pnas.1216057111
  27. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al (2009) Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09
  28. Mercier C, Boyer F, Bonin A, Coissac E (2013) SUMATRA and SUMACLUSt: fast and exact comparison and clustering of sequences. *Abstr SeqBio 25-26th Nov 2013* 27. doi: 10.1002/ejoc.201200111
  29. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261–5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07
  30. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, et al (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72:5069–5072. doi: 10.1128/AEM.03006-05
  31. Work TT, Jacobs JJ, Spence JR, Volney WJ a (2010) Higher levels of variable retention required to maintain ground beetle biodiversity in boreal mixedwood forests. *Ecol Appl* 20:741–751. doi: 10.1890/08-1463.1
  32. De Cáceres M, Legendre P, Wiser SK, Brotons L (2012) Using species combinations in indicator value analyses. *Methods Ecol Evol* 3:973–982. doi: 10.1111/j.2041-210X.2012.00246.x
  33. Chao A (1949) On the Estimation of the Number of Classes in a Population. *Ann Math Stat* 20:572–579. doi: 10.1214/aoms/1177729949
  34. Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40:237–264. doi: 10.1093/biomet/40.3-4.237
  35. Eevers N, Gielen M, Sánchez-López A, et al (2015) Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media. *Microb Biotechnol*. doi: 10.1111/1751-7915.12291
  36. Francois F, Lombard C, Guigner J-M, et al (2012) Isolation and Characterization of Environmental Bacteria Capable of Extracellular Biosorption of Mercury. *Appl Environ Microbiol* 78:1097–1106. doi: 10.1128/AEM.06522-11
  37. Becerra-Castro C, Kidd PS, Prieto-Fernández Á, et al (2011) Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: Isolation and characterisation. *Plant Soil* 340:413–433. doi: 10.1007/s11104-010-0613-x
  38. Mark Ibekwe a., Kennedy AC, Halvorson JJ, Yang C-H (2007) Characterization of developing microbial communities in Mount St. Helens pyroclastic substrate. *Soil Biol Biochem* 39:2496–2507. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.05.010
  39. Durand A, Piutti S, Rue M, et al (2015) Improving nickel phytoextraction by co-cropping hyperaccumulator plants inoculated by plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Soil* 399:179–192. doi: 10.1007/s11104-015-2691-2
  40. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98. doi: citeulike-article-id:691774

41. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673
42. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121
43. Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol Biol* 16:
44. Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160:47–56.
45. Alexander DB, Zuberer D a. (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fertil Soils* 12:39–45. doi: 10.1007/BF00369386
46. Barillot C (2012) Étude des potentialités rhizoremédiatrices et de la diversité des bactéries rhizosphériques d'Arabidopsis halleri, plante hyperaccumulatrice de Zn et Cd. Université de Lorraine
47. Mehta S, Nautiyal CS (2001) An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr Microbiol* 43:51–56. doi: 10.1007/s002840010259
48. Baldani VLD, Döbereiner J (1980) Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol Biochem* 12:433–439.
49. Poulain AJ, Aris-Brosou S, Blais JM, et al (2015) Microbial DNA records historical delivery of anthropogenic mercury. *ISME J* 1–10. doi: 10.1038/ismej.2015.86
50. Laguerre G, Nour SM, Macheret V, et al (2001) Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 981–993.
51. Samczyński Z, Dybczyński RS, Polkowska-Motrenko H, et al (2012) Two new reference materials based on tobacco leaves: certification for over a dozen of toxic and essential elements. *ScientificWorldJournal*. doi: 10.1100/2012/216380
52. Maillard F, Girardclos O, Assad M, et al (2016) Dendrochemical assessment of mercury releases from a pond and dredged-sediment landfill impacted by a chlor-alkali plant. *Environ Res* 148:122–126. doi: 10.1016/j.envres.2016.03.034
53. Team RC (2014) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014.
54. Coleman-Derr D, Desgarennes D, Fonseca-Garcia C, et al (2015) Biogeography and cultivation affect microbiome composition in the drought-adapted plant Subgenus *Agave*. *New Phytol* 209:798–811. doi: 10.1111/nph.13697
55. Redford AJ, Fierer N (2009) Bacterial succession on the leaf surface: A novel system for studying successional dynamics. *Microb Ecol* 58:189–198. doi: 10.1007/s00248-009-9495-y
56. Jakuschkin B, Fievet V, Schwaller L, et al (2016) Deciphering the Pathobiome: Intra- and Interkingdom Interactions Involving the Pathogen *Erysiphe alphitoides*. *Environ Microbiol* 1–11. doi: 10.1007/s00248-016-0777-x
57. Gloor GB, Hummelen R, Macklaim JM, et al (2010) Microbiome profiling by Illumina sequencing of combinatorial sequence-tagged PCR products. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0015406
58. Knief C, Delmotte N, Chaffron S, et al (2012) Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME J* 6:1378–1390. doi: 10.1038/ismej.2011.192
59. Lambais MR, Lucheta AR, Crowley DE (2014) Bacterial Community Assemblages Associated with the Phyllosphere, Dermosphere, and Rhizosphere of Tree Species of the Atlantic Forest are Host Taxon Dependent. *Microb Ecol* 68:567–574. doi: 10.1007/s00248-014-0433-2
60. Dombrowski N, Schlaeppli K, Agler MT, et al (2016) Root microbiota dynamics of perennial *Arabidopsis alpina* are dependent on soil residence time but independent of flowering time. *ISME J* 1–13. doi: 10.1038/ismej.2016.109
61. Barton HA, Giarrizzo JG, Suarez P, et al (2014) Microbial diversity in a Venezuelan orthoquartzite cave

- is dominated by the Chloroflexi (Class Ktedonobacterales) and Thaumarchaeota Group I.1c. *Front Microbiol* 5:1–14. doi: 10.3389/fmicb.2014.00615
62. Lopez S, Piutti S, Vallance J, et al (2017) Nickel drives bacterial community diversity in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Alyssum murale*. *Soil Biol Biochem* 114:121–130. doi: 10.1016/j.soilbio.2017.07.010
  63. Sas-Nowosielska A, Galimska-Stypa R, Kucharski R, et al (2008) Remediation aspect of microbial changes of plant rhizosphere in mercury contaminated soil. *Environ Monit Assess* 137:101–109. doi: 10.1007/s10661-007-9732-0
  64. Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, et al (2008) Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil* 304:35–44. doi: 10.1007/s11104-007-9517-9
  65. Schmidt A, Haferburg G, Schmidt A, et al (2009) Heavy metal resistance to the extreme: *Streptomyces* strains from a former uranium mining area. *Chemie der Erde - Geochemistry* 69:35–44. doi: 10.1016/j.chemer.2007.11.002
  66. Kunito T, Saeki K, Nagaoka K, et al (2001) Characterization of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. *Eur J Soil Biol* 37:95–102. doi: 10.1016/S1164-5563(01)01070-6
  67. Álvarez A, Catalano SA, Amoroso MJ (2013) Heavy metal resistant strains are widespread along *Streptomyces* phylogeny. *Mol Phylogenet Evol* 66:1083–1088. doi: 10.1016/j.ympev.2012.11.025
  68. Mattimore V, Battista JR (1996) Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: Functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J Bacteriol* 178:633–637. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00397.x
  69. Knief C, Ramette A, Frances L, et al (2010) Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere. *ISME J* 4:719–728. doi: 10.1038/ismej.2010.9
  70. Smets W, Wuyts K, Oerlemans E, et al (2016) Impact of urban land use on the bacterial phyllosphere of ivy (*Hedera* sp.). *Atmos Environ* 147:376–383. doi: 10.1016/j.atmosenv.2016.10.017
  71. Moore FP, Barac T, Borremans B, et al (2006) Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Syst Appl Microbiol* 29:539–556. doi: 10.1016/j.syapm.2005.11.012
  72. Rivas R, García-Fraile P, Mateos PF, et al (2007) Characterization of xylanolytic bacteria present in the bract phyllosphere of the date palm *Phoenix dactylifera*. *Lett Appl Microbiol* 44:181–187. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02050.x
  73. Hosoda A, Sakai M, Kanazawa S (2003) Isolation and characterization of agar-degrading *Paenibacillus* spp. associated with the rhizosphere of spinach. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:1048–1055. doi: 10.1271/bbb.67.1048
  74. Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E (2005) *Paenibacillus phyllosphaerae* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the phyllosphere of *Phoenix dactylifera*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:743–746. doi: 10.1099/ijs.0.63323-0
  75. Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J Biotechnol* 91:127–141. doi: 10.1016/S0168-1656(01)00333-9
  76. Baudoin E, Benizri E, Guckert A (2003) Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 35:1183–1192. doi: 10.1016/S0038-0717(03)00179-2
  77. Chebotar' VK, Makarova NM, Shaposhnikov a I, Kravchenko L V (2009) Antifungal and phytostimulating characteristics of *Bacillus subtilis* Ch-13 rhizospheric strain, producer of biopreparations. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 45:465–469. doi: 10.1134/S0003683809040127
  78. Yu X, Ai C, Xin L, Zhou G (2011) The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *Eur J Soil Biol* 47:138–145. doi: 10.1016/j.ejsobi.2010.11.001
  79. Zaidi S, Usmani S, Singh BR, Musarrat J (2006) Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a

- bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere* 64:991–997.
80. Preston GM (2004) Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359:907–918. doi: 10.1098/rstb.2003.1384
  81. Sturz A V., Christie BR, Matheson BG, Nowak J (1997) Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol Fertil Soils* 25:13–19. doi: 10.1007/s003740050273
  82. Schreiber L, Krimm U, Knoll D, et al (2004) Plant – microbe interactions : identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytol* 166:589–594.
  83. Behrendt U, Ulrich A, Schumann P, et al (1999) A taxonomic study of bacteria isolated from grasses: a proposed new species *Pseudomonas graminis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49:297–308. doi: 10.1099/00207713-49-1-297
  84. Hutner SH (1972) Inorganic Nutrition. *Annu Rev Microbiol* 26:313–346. doi: 10.1146/annurev.mi.26.100172.001525
  85. Knoth JL, Kim SH, Ettl GJ, Doty SL (2014) Biological nitrogen fixation and biomass accumulation within poplar clones as a result of inoculations with diazotrophic endophyte consortia. *New Phytol* 201:599–609. doi: 10.1111/nph.12536
  86. Podile a R, Laxmi VD V (1998) Seed Bacterization with *Bacillus subtilis* AF 1 Increases Phenylalanine Ammonia-lyase and Reduces the Incidence of Fusarial Wilt in Pigeonpea. *J Phytopathol* 146:255–259. doi: 10.1111/j.1439-0434.1998.tb04687.x

### 4.3.2 Bilan et mise en perspective des travaux

Dans un premier temps, cette publication décrit les communautés bactériennes des quatre habitats dont l'ADNe a été échantillonné (sol, racines tiges et feuilles). De plus, l'essentiel des OTUs a été assigné au niveau du phylum pour tous les habitats. Les données montrent que la diversité bactérienne est plus faible dans la phyllosphère que dans le sol ou au niveau des racines et mettent en avant certains groupes bactériens caractéristiques de chaque habitat. Dans l'ensemble, ces données sont une bonne base pour appréhender les communautés de bactéries dans l'écosystème forestier particulier qu'est la peupleraie.

Cependant, l'amplification de chloroplastes dans les échantillons de la phyllosphère (40% des séquences environ) soulève des questions. Ce constat survient malgré les mises au point en amont en laboratoire et malgré la veille scientifique. En effet, nous avons utilisé les mêmes amorces qu'une étude utilisant la technologie Illumina sur la phyllosphère de 57 espèces d'arbres de la forêt tropicale (Kembel *et al.*, 2014). Pourtant, il semblerait que des amorces spécifiques soient nécessaires pour éviter l'amplification des chloroplastes de peuplier, puisque des publications postérieures à la nôtre montrent des taux inférieurs à 1 % d'amplification de chloroplastes dans la phyllosphère avec les amorces suivantes : l'amorce 799F (5'-AACMGGATTAGATACCCKG-3'), contenant 3 « mismatches » avec l'ARNr 16S chloroplastique du peuplier, et l'amorce 1391R (5'-GACGGGC GGTGWGTRCA-3') (Beckers *et al.*, 2016, 2017). Ces amorces ont été utilisées avec du séquençage Roche 454 et ne semblent pas idéales pour la technologie Illumina. En effet, comme mentionnée plus tôt dans l'introduction, la technologie Illumina actuelle ne permet pas d'obtenir des amplicons de plus de 300 pb environ alors que la technologie Roche 454 le permet plus facilement. Or, ce couple d'amorces produit en théorie des amplicons de 592 pb. De plus, grâce à la puissance de séquençage Illumina MiSeq, notre étude a détecté un nombre supérieur de séquences comparée aux publications mentionnées plus tôt dans ce paragraphe.

Nos travaux ont également permis d'évaluer les effets du Hg sur la cultivabilité des bactéries pour sept habitats distincts en séparant les organismes endophytes des épiphytes. En général, nous avons montré que les bactéries cultivables du sol sont plus résistantes au Hg que celles des parties aériennes et que les épiphytes sont plus résistantes que les endophytes. Parmi les résultats inattendus, nous mentionnerons la présence de PGPB résistantes au Hg qui posséderaient des capacités de fixation d'N atmosphériques isolées depuis l'épispère des tiges et des feuilles (*Pseudomonas graminis*). L'inoculation du poivron exposé à du Hg atmosphérique, par certains des meilleurs isolats du sol et des parties aériennes a permis de mettre en évidence un accroissement significatif de la biomasse sèche racinaire ce qui confirme

le potentiel de l'inoculum bactérien. De plus, le cultivar de poivron Yolo wonder (*Capicum annum*) s'est révélé être un bioindicateur efficace de Hg atmosphérique.

Cependant, l'approche culture-dépendante porte bien son nom, et le problème majeur des isollements bactériens est lié à la limite des conditions de culture bactérienne. Par exemple, les microorganismes potentiellement anaérobies n'ont pas pu être isolés par notre approche alors qu'ils pourraient s'avérer essentiels, notamment pour la méthylation du Hg qui n'est possible qu'en condition anaérobie par des bactéries réductrices de sulfate ou de fer (Gilmour *et al.*, 2013; Parks, 2013; Podar *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2016). Des essais d'isolement en condition anaérobie avec les mêmes milieux de cultures (869 et 284) ont été menés en confectionnant des Jarres anaérobies à l'aide Anaerocult® qui se composent de sachets filtrants en papier de différentes dimensions, contenant la combinaison de réactifs fixant l'oxygène (à base de palladium) et produisant du CO<sub>2</sub> (BBL™GasPakPlus™, Becton Dickinson and Company, Nevada, USA). Cependant les résultats ne se sont pas révélés concluants, probablement du fait de la composition et des conditions inappropriées lors de la culture. Par ailleurs, l'inoculation du poivron n'a pas permis de montrer une augmentation de la biomasse totale bien que la tendance constatée soit positive. Une inoculation dans des conditions différentes (plus tôt dans la croissance du poivron, dans des phytotrons plus grands, avec davantage de réplicats, ou encore dans des pots plus grands) aurait potentiellement permis de constater davantage les effets de l'inoculation sur la croissance. De plus, l'accumulation du Hg dans le poivron n'a pas été significativement différente avec et sans inoculation. Toutefois, l'expérience menée n'exclut pas l'hypothèse d'une augmentation de l'interception du Hg au niveau foliaire par des bactéries spécifiques. Il s'agirait de tester d'autres microorganismes aux propriétés différentes ou/et dans des conditions contrôlées différentes (par exemple faire varier les concentrations de Hg atmosphérique). Il se pourrait également que les effets ne soient visibles que sur une période plus longue.

De plus, la confrontation des données issues du séquençage et des méthodes plus traditionnelles d'isolement de bactéries a permis de montrer la complémentarité des deux approches pour appréhender le microbiome. Par exemple, des PGPB Hg-résistantes du genre *Pseudomonas* ont été isolées depuis la phyllosphère, tandis que le métabarcoding montre que ce genre de bactéries se retrouve le plus au niveau des feuilles et constitue 1 % du microbiome de cet habitat. Nos résultats montrent également que l'isolement des bactéries depuis leur habitat est une forme de sélection de bactéries spécifiques au sein de la communauté qui n'implique pas systématiquement l'isolement des microorganismes les plus détectés par métabarcoding.

La comparaison des deux approches (cultures et métabarcoding) est cependant limitée par la qualité de l'assignement taxonomique des OTUs, nettement inférieure à la qualité d'assignement des isolats bactériens que l'on peut obtenir. En effet, comme le montre la Table S1 dans la publication, les taux d'assignement au genre restent faibles avec la technologie Illumina MiSeq, par exemple dans le sol, seuls 22,9 % des OTUs sont assignés au genre. De fait, l'assignement à l'espèce des bactéries est extrêmement faible (Tableau 16).

**Tableau 16 : Nombre de séquences assignées au rang taxonomique de l'espèce (Durand et al. 2017, soumis). Les nombres entre parenthèses correspondent aux pourcentages de « séquences effectives totales normalisées » assignées à l'espèce. Les feuilles comportent 22 échantillons, les tiges 21, les racines 23 échantillons et le sol 24.**

Habitats	Séquences effectives totales normalisées	Séquences assignées jusqu'à l'espèce
<b>Sol</b>	72 000 (100 %)	1 151 (1,61 %)
<b>Racines</b>	69 000 (100 %)	3 971 (5,76 %)
<b>Tiges</b>	63 000 (100 %)	4 891 (7,76 %)
<b>Feuilles</b>	66 000 (100 %)	6 037 (9,14 %)

Ce problème est lié à la taille réduite des amplicons produits lors du séquençage Illumina MiSeq actuel qui ne permet pas d'obtenir des amplicons de plus de 300 pb et rend l'identification taxonomique plus difficile pour les niveaux les plus bas de la taxonomie (genres et espèces). L'obtention d'amplicons de plus grandes tailles est donc un enjeu pour les technologies de séquençages dans le cadre du métabarcoding.

### 4.3.3 Contrainte des expériences d'inoculation de PGPB

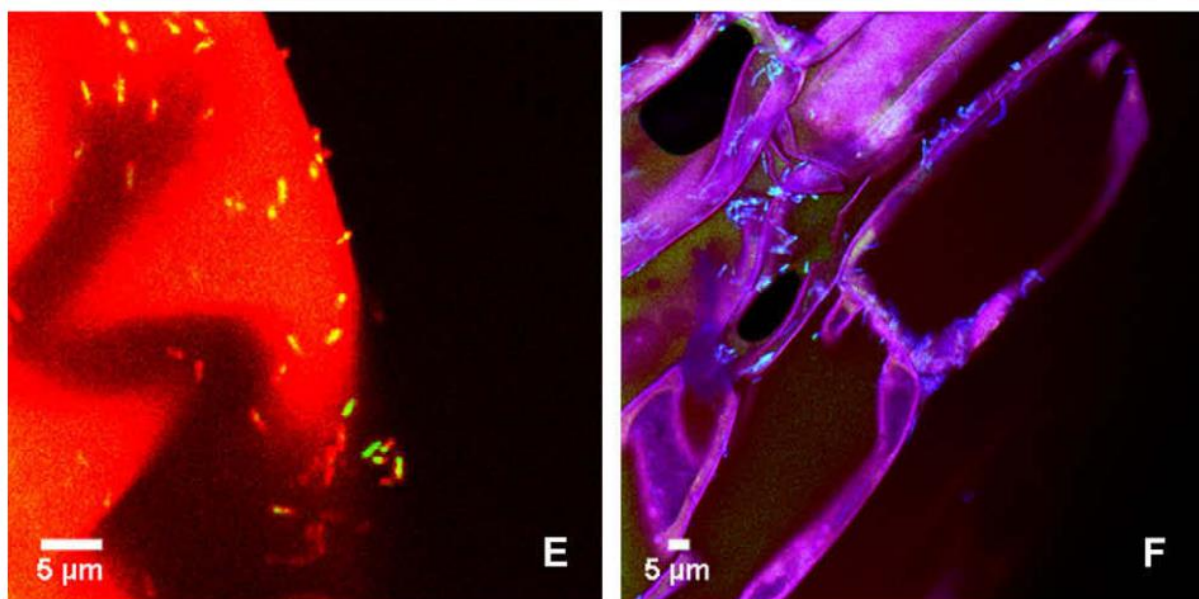
Même en cas de succès de l'inoculation, encore aurait-il fallu démontrer que les microorganismes se sont implantés avec succès, un défi rarement relevé dans la littérature scientifique. En effet, il est nécessaire de prouver que la souche bactérienne est toujours vivante, il faudrait donc la réisoler ou la détecter *in situ* parmi les autres microorganismes.

Une première approche pour ce faire consisterait à utiliser des résistances antibiotiques pour discriminer les bactéries inoculées des bactéries natives du milieu, puis de les réisoler sur milieux gélosés enrichis en antibiotiques. Bien que théoriquement envisageable, il y a plusieurs limites qui s'y opposent. Premièrement, il serait nécessaire d'ajouter une multitude de gènes de résistance à la bactérie à inoculer puisque les bactéries de la communauté peuvent également être résistantes à certains antibiotiques. Ensuite, il faudrait insérer un plasmide et vérifier que la croissance et l'activité de la bactérie ne sont pas affectées. De plus, le plasmide est sujet à des risques de transferts horizontaux vers les communautés de bactéries indigènes, ce qui pose des problèmes éthiques liés aux organismes génétiquement modifiés. En outre, cette méthode ne permet pas de déterminer précisément la localisation de la bactérie ou d'évaluer de façon précise la qualité de l'implantation de la bactérie dans son habitat. L'utilisation de ce type de



souches bactériennes modifiées est rare lors d'expériences en conditions contrôlées. Un groupe de scientifiques a déjà inoculé des *Pseudomonas putida*, modifiées génétiquement pour être multi-résistantes à divers antibiotiques, sur des graines, pour étudier les gènes bactériens d'adhésion aux plantes (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000). Une seconde approche pour la détection de bactéries inoculées serait d'établir le profil génétique de la bactérie avant inoculation puis, après isolement, de détecter ce profil génétique. Il faudrait utiliser des marqueurs génétiques tels que le marqueur génétique 16S. Cependant, il est trop imprécis pour discriminer les souches bactériennes les unes des autres. Il faudrait donc une synergie de plusieurs marqueurs génétiques caractéristiques de la souche et peut être combiner une approche par box-PCR et par sélection antibiotique, pour pouvoir obtenir des profils discriminant les souches de façon certaine. Quand bien même cette tâche accomplie, la stabilité du génome d'une bactérie sur des semaines d'incubation n'est pas garantie, il est donc possible que les profils mis au point avant l'inoculation ne soient plus exacts après un certain temps. Il est très difficile de trouver des équipes qui pratiquent couramment ce genre de méthode pour valider leur expérience d'inoculation. En effet, les contraintes sont trop importantes pour des résultats imprécis.

Bien que le réisolement de souches après inoculation semble compromis, des équipes travaillent depuis longtemps sur la détection *in situ* de bactéries modifiées qui, produisant de la fluorescence *in situ*, sont donc détectables dans leur habitat après leur inoculation. Brièvement, la méthodologie d'hybridation en fluorescence *in situ* ou « fluorescence *in situ* hybridization » (FISH) consiste à identifier les bactéries *via* des sondes fluorescentes s'y fixant spécifiquement puis à localiser les bactéries dans leur habitat par observation au microscope à balayage laser. La sonde n'est autre qu'un oligonucléotide avec des groupements fluorescents qui peut se fixer à de l'ADN spécifique d'un groupe de microorganismes. En outre, il est possible de combiner des sondes pour affiner la détection, par exemple, pour détecter une espèce de bactérie. Cette méthode a été utilisée pour retrouver des espèces bactériennes inoculées au niveau des racines (Oliveira *et al.*, 2009) (Figure 64), mais aussi pour permettre de détecter des bactéries endophytes de plantes (Schmid *et al.*, 2007) et d'évaluer la structure des populations bactériennes dans les sols (Kliot *et al.*, 2014).



**Figure 64** : Images obtenues par microscope à balayage laser tirées des travaux de Oliveira et al. (2009), (E) : détection par FISH de *Gluconacetobacter diazotrophicus* et *Herbaspirillum seropedicae* après 72 h d'inoculation sur l'épiderme racinaire en utilisant trois sondes (ALF-1B-Fluos, Hrubri-445-Cy5, et Herso-445-Cy3), (F) : détection FISH de *Herbaspirillum seropedicae* après 24 h d'inoculation sur l'épiderme racinaire en utilisant les trois sondes EUB-338-I, II, III-Fluos, Adia- Cy3 et HERB-Cy5.

Pour détecter des bactéries *in situ* la protéine fluorescente verte (ou « Green Fluorescent Protein », GFP) est également utilisée. La GFP est une protéine qui émet une fluorescence intrinsèque verte et le gène codant de cette protéine peut être transféré via un plasmide dans de nombreuses cellules, notamment des bactéries. Une fois transformée, la bactérie produira une bioluminescence dans son environnement, détectable par microscopie à fluorescence sous lumière UV. La méthode a déjà été utilisée dans de nombreuses publications, elle a, par exemple, permis d'étudier la bactérie endophyte *Pseudomonas sp.* Ph6 dégradant le phénanthrène et de montrer que l'inoculation au niveau racinaire de la bactérie était suivie par une migration de celle-ci vers la partie aérienne chez la plante *Lolium multiflorum* (l'ivraie) (Sun *et al.* 2014). La bactérie a en effet été visualisée aussi bien dans les racines que la tige ou les feuilles (Figure 65). La même migration des racines vers les parties aériennes de bactéries inoculées au niveau du sol a été observée pour la bactérie *Bacillus subtilis* (souche B916-gfp) chez le maïs (Sun *et al.*, 2017). Pour le manuscrit présenté dans ce chapitre 2, se pose donc la question du transfert de l'inoculum rhizosphérique vers la phyllosphère. D'autres auteurs ont par ailleurs fait remarquer que le marquage GFP des bactéries pourrait changer la réponse de la plante vis-à-vis de l'inoculation (Padda *et al.*, 2016). En effet, dans leur étude sur la PGPB fixatrice d'N *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R inoculée sur des graines de canola, les auteurs montrent que les bactéries transformées (P2b-2Rgfp) comparées à celles non transformées (P2b-2R) augmentent la biomasse significativement plus (69 % d'augmentation). Le marquage

GFP pourrait donc influencer les résultats de promotion de croissance de la plante, ainsi un inoculum contrôle non marqué par une GFP est indispensable.

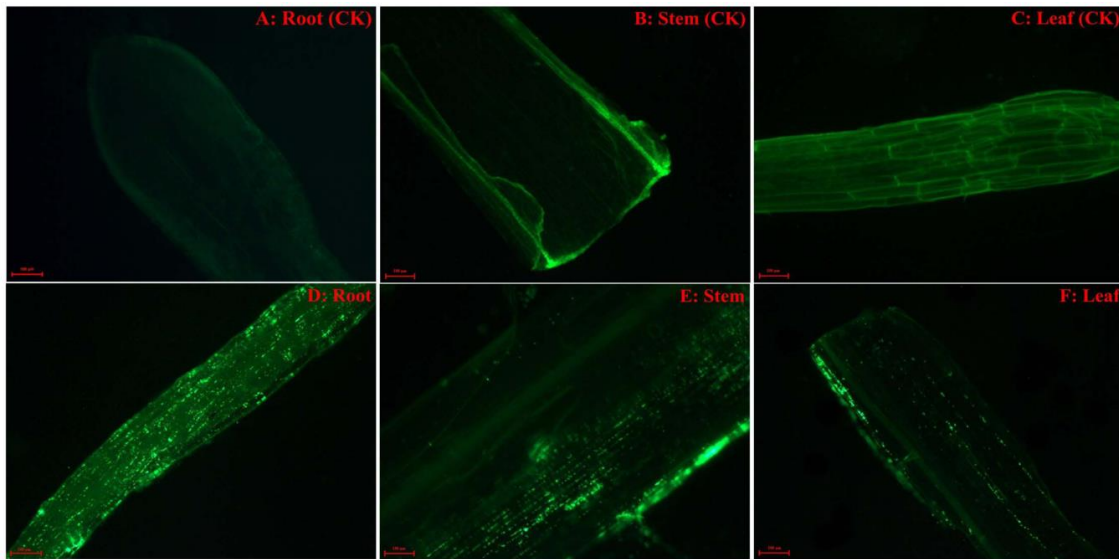


Figure 65 : Images obtenues par microscopie à fluorescence sous lumière UV issues des travaux de Sun et al. (2014), Détection de *Pseudomonas* sp. Ph6-gfp après inoculation dans les racines, (D) dans les tiges (E) et dans les feuilles (F) ; (A), (B) et (C) servent de contrôle non inoculé.

Cette méthode permet donc d'obtenir des informations sur la localisation des inoculas bactériens colonisateurs des tissus de la plante. Qui plus est, il se trouve que la fluorescence de la GFP émise par une bactérie est inversement proportionnelle à la quantité de division cellulaire (Remus-Emsermann & Leveau, 2010) (Figure 66).

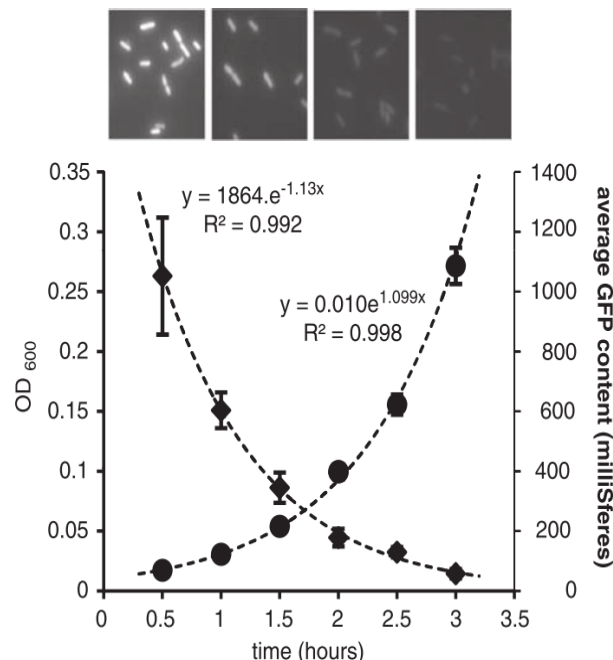


Figure 66 : Turbidité cellulaire et fluorescence moyenne de la GFP dans le cadre d'une culture en milieu LB agité de *Erwinia herbicola* Eh299RH JBA28 (pCPP39). Au-dessus, les images ont été obtenues par microscopie à fluorescence sous lumière UV à t = 0, 1, 2 et 3 h de gauche à droite montrant la bactérie (pCPP39) marquée par GFP (Remus-Emsermann & Leveau, 2010).

Cette dilution de la fluorescence de la GFP avec le nombre de divisions cellulaires permet donc d'estimer un facteur introduit par les auteurs comme étant le succès reproductif (ou « reproductive success ») de la bactérie initialement inoculée. Cette méthodologie nommée « CUSPER bioreporter » a ainsi permis de révéler que les bactéries inoculées sur la feuille contribuent, en définitive, de façon hétérogène en fonction du site de colonisation à la taille de la communauté future. En effet, une étude approfondie a montré que la disponibilité locale en nutriments est un facteur majeur du succès reproductif (Remus-Emsermann *et al.*, 2012). De plus, les auteurs ont pu distinguer trois types de sites de colonisation sur la feuille : riche, moyen et pauvre en termes de capacité d'accueil, avec une grande majorité de sites moyen et pauvre et une répartition hétérogène de quelques sites riches. Ainsi, assez naturellement, le succès reproductif de la plupart des bactéries inoculées diminue avec l'augmentation de la densité de l'inoculation. Cette technique pourrait être très utile pour déterminer les concentrations optimales des isolats bactériens avant inoculation.

#### **4.3.4 Le poivron : un bioindicateur de la contamination du Hg atmosphérique**

Une thèse précédente portant sur le transfert des éléments métalliques vers les végétaux (Assad, 2017) a montré, entre autres choses, que les quantités de Hg détectées dans les feuilles de peuplier s'accumulaient exclusivement par voie atmosphérique. Par ailleurs, certains Solanacées (poivron ou tabac) pourraient intercepter le Hg atmosphérique en grande quantité (éventuellement dépendante du cultivar) dans leurs feuilles mais pas dans leurs fruits. Notre étude confirme que le poivron accumule de façon importante le Hg et, essentiellement, au niveau de ses feuilles (Figure 67).

Pour confirmer le potentiel du poivron en tant que bioindicateur pour la détection et quantification de la pollution atmosphérique du Hg, nous travaillons actuellement en collaboration avec un bureau d'étude en charge de la réhabilitation d'un site contaminé par le Hg. Des poivrons adultes ont été plantés à différentes distances de la source de contamination (sur une superficie totale de 2 ha) du site et la quantité de Hg dans leurs feuilles ont été (seront) évaluée 1, 2 et 3 mois après implantation. L'expérience est en cours, mais les premiers résultats (1 mois) sont encourageants, montrant des concentrations plus importantes à proximité des sources de Hg et négligeables à plus longue distance, mais aussi que les feuilles les plus âgées semblent accumuler davantage sur le terrain (Figure 68).

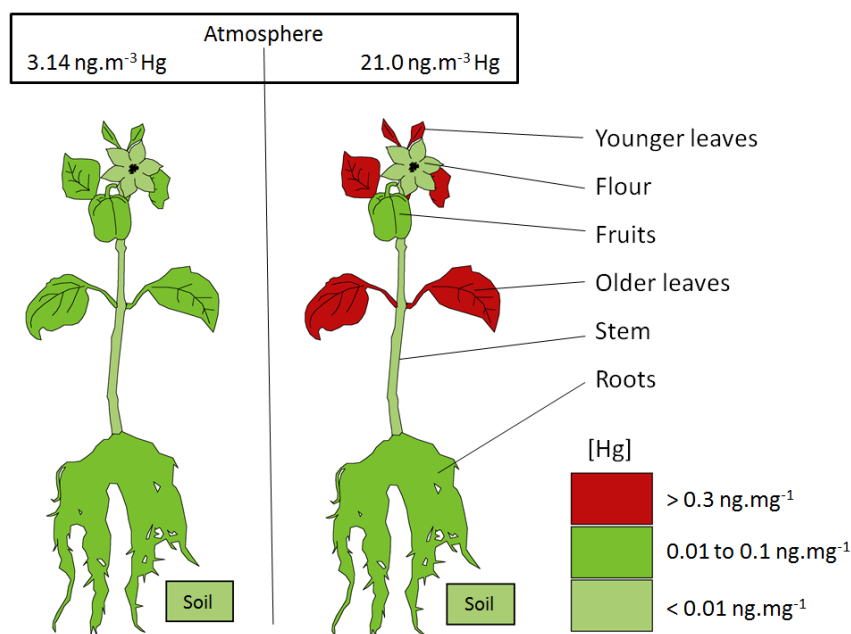


Figure 67 : Accumulation de Hg dans *Capsicum annuum* (Poivron cultivar Yolo Wonder) après 46 jours d'exposition au Hg dans les conditions de culture présentées dans le manuscrit du chapitre 2 (Guinchard, 2017).

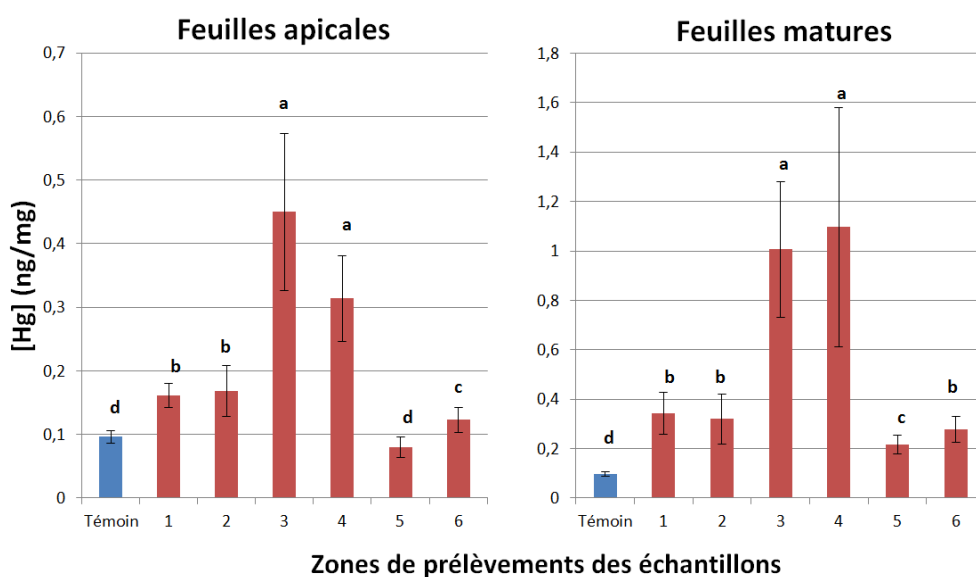


Figure 68 : Accumulation du Hg dans les feuilles de poivron sur le site industriel au bout d'un mois d'exposition. Les zones 3 et 4 sont les plus proches de la source de contamination, les témoins sont des poivrons non exposés à l'atmosphère du site, prélevés à T0. La déviation standard est représentée, des lettres différentes représentent des différences significatives,  $p < 0,01$

En résumé, le faible coût, la facilité de germination, de culture et d'entretien, l'accumulation rapide dans les feuilles en atmosphère contaminée (2 semaines à 1 mois), le seuil de détection faible (Assad, 2017), la très faible accumulation du Hg dans les tissus consommables par l'Homme et l'accumulation dépendante de la distance de la source, sont autant de caractéristiques du poivron qui en font un bon bioindicateur de contamination du Hg atmosphérique.



## Chapitre 4 :troisième partie

---

accumulation (17) activities (9) **alr** (27) **anserina** (33)  
cations (15) **cells** (26) **cerevisiae** (40) compartments (10)  
**concentrations** (27) conditions (15) data (15) desorption (11)  
environment (9) experiment (11) **exposure** (26) fungal (13) **fungi** (19)  
gene (9) gradient (9) **growth** (14) hcc (12) **hg** (168) **hgcl** (36)  
**incubation** (26) **inhibitors** (13) ions (9) mechanisms (10)  
**medium** (40) membrane (12) **mg** (47) **mgcl** (17) mycelia (11)  
mycelium (19) plasma (9) **protein** (16) rate (9) **solution** (15)  
**strain** (62) **tolerance** (14) transferred (10) **transport** (41)  
**uptake** (60) **wild** (11) **yeast** (18) **ypd** (12)

*Analyse sémantique du chapitre 4 : troisième partie*

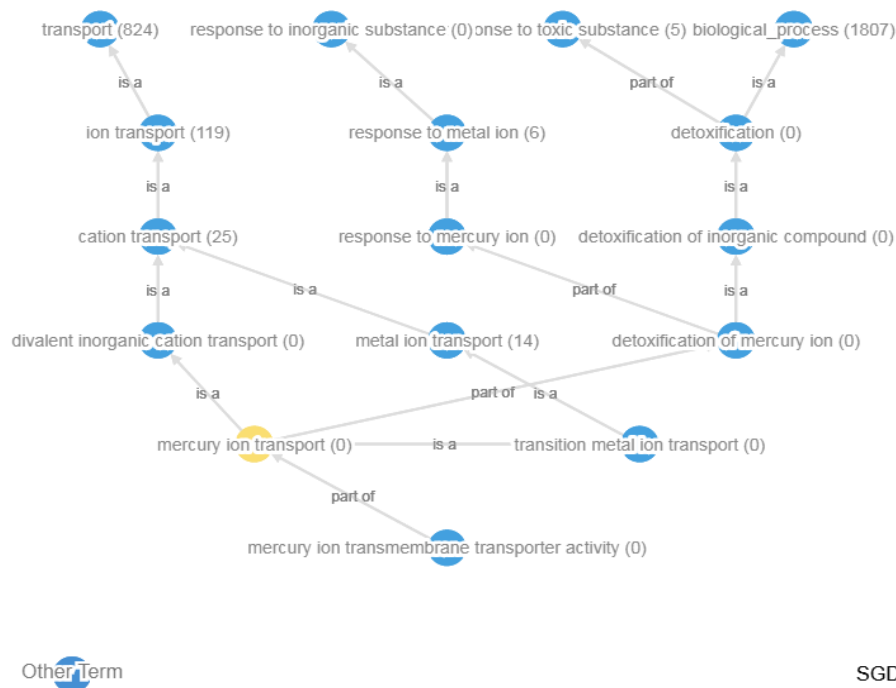




## 4.4 Le transporteur de Mg GeneX est impliqué dans l'accumulation du Hg chez les champignons : Étude sur les modèles *Podospora anserina* et *Saccharomyces cerevisiae*.

### 4.4.1 Contexte et publication

Le transport du Hg dans les cellules eucaryotes est un domaine de la science où peu de données sont disponibles comme le montre l'état actuel de nos connaissances chez *S. cerevisiae*, qui est peut-être pourtant le modèle d'étude le plus répandu. En effet, la recherche « mercury ion transport » sur le site Saccharomyces Genome Database (SGD)<sup>19</sup> nous donne le résultat suivant (Figure 69):



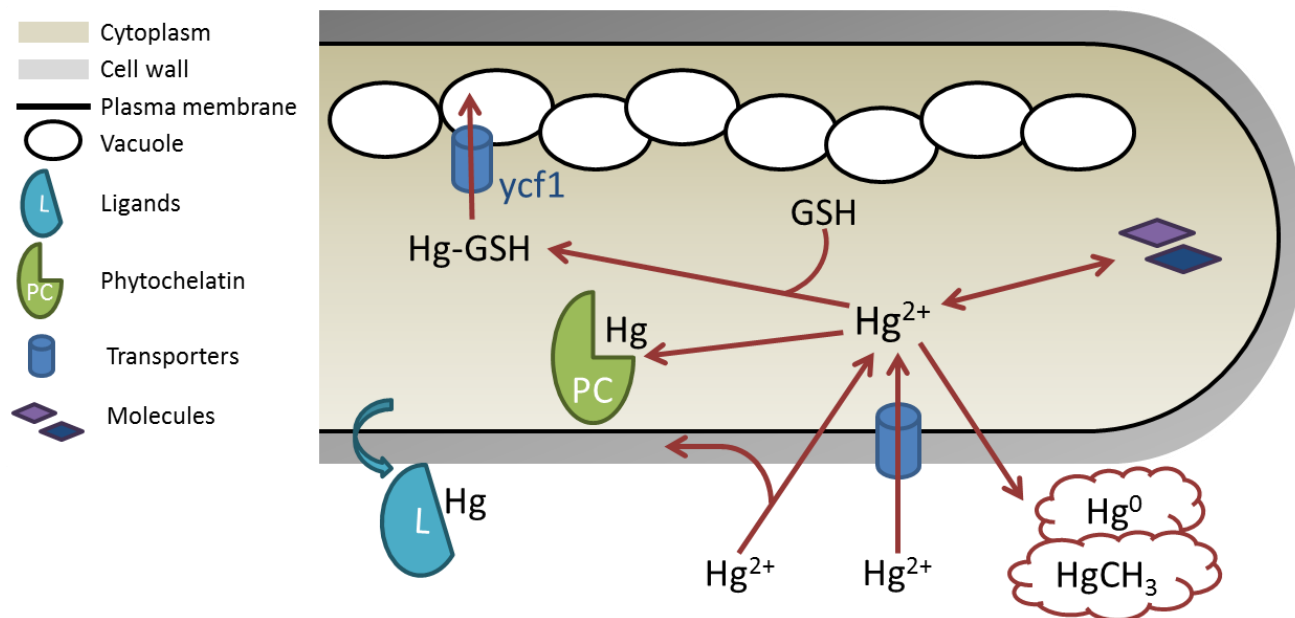
**Figure 69 : Diagramme ontologique autour des termes « mercury ion transport » chez *S. cerevisiae*. Les nombres entre parenthèses correspondent à la quantité de références scientifiques chez *S. cerevisiae* liées aux termes mentionnés au niveau des disques.**

Cette figure montre que peu de données sont recensées sur ce thème et sur les sujets en relation, pourtant les champignons disposent de capacités d'accumulation et de tolérance importantes vis-à-vis du Hg présent dans leur tissu comme décrit dans l'introduction (voir chapitre 1 : 4.1). A l'aide des organismes modèles *S. cerevisiae* et *P. anserina*, la publication qui suit décrit la mise en évidence d'un mécanisme de transport du Hg vers la cellule fongique.

<sup>19</sup> <https://www.yeastgenome.org/go/GO:0015694>

## The Plasma membrane transporter GeneX is required for Hg uptake in fungal cells

Durand Alexis<sup>a</sup>, J. Foulon<sup>a</sup>, S. Guinchard<sup>c</sup>, N. Grosjean<sup>b</sup>, D. Blaudez<sup>b</sup>, M. Chalot<sup>ac</sup>



<sup>a</sup> Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France

<sup>b</sup> Université de Lorraine, UMR CNRS 7360 Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506, Vandœuvre-lès-Nancy, France

<sup>c</sup> Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

**\*Corresponding author:** Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France

Tel: +33 3 81 99 46 76,

Email: [michel.chalot@univ-fcomte.fr](mailto:michel.chalot@univ-fcomte.fr)

## Abstract

Mercury (Hg) is one of the most toxic and hazardous metals found in the environment and affects all groups of organisms and ecosystems. Fungi are bioaccumulating elevated amount of Hg, nonetheless, little is known about cellular uptake mechanisms of this metal. In this study, deletions of *ScGeneX/2* (*Saccharomyces cerevisiae*) and *PaGeneX* (*Podospora anserina*) both coding for plasma membrane Ion transporters leads to a significant decreased of Hg uptake in the fungal models, respectively around 3 times and 5 times less. Furthermore, increase of  $MgCl_2$  concentration in the medium during  $HgCl_2$  exposure decreased Hg uptake by *S. cerevisiae*, while increasing Hg tolerance of the yeast. We also showed that Hg uptake is reduced by carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) and 2,4-dinitrophenol (DNP) in *P. anserina* mycelia, respectively up to 24% and 22%, which indicates that transport of Hg was partially dependent on the membrane potential and ATP dependent activities. In addition, hexamine (III) cobalt chloride (HCC) inhibited Hg uptake by 29% implying that active transport of Mg were correlated with Hg uptake. Besides, we revealed a high proportion of Hg bound to sulfhydryl groups (-SH) in the protein fraction of *P. anserina* mycelium when exposed to Hg in liquid medium. These results implied that Hg uptake into eukaryotic cells is dependent of Mg transporter GeneX.

**Key words:** Mercury, GeneX - GeneY, *Saccharomyces cerevisiae*, *Podospora anserina*, Mercury uptake, Fungi

## Introduction

Hg is the 16<sup>th</sup> rarest element on Earth and is classified as a trace element (TE) one of the quantitatively most important pollutants group. Hg is a contaminant which affects all groups of organisms and ecosystems including microbial communities [1, 2], fishes ([3], plants [4, 5], birds ([6] and humans ([7]. Background levels of Hg are around 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  soil dry mass (DM) [8, 9], however with significant local variations. Hg is released from natural sources such as volcanic activities, oceans and biomass burning due to natural fires [10] and from anthropogenic sources like gold, lead or silver mining, chlor-alkali plants and consumption of fossil fuels such as coal, gas and oil containing Hg in non-negligible amounts [11–13]. Thereby, an investigation of Hg cycles and transfers in the biosphere is needed to elucidate the fate of the Hg emitted into the aquatic [14] and terrestrial [15] environments, to estimate and prevent the future development of Hg contaminations.

The ecological surveys of Hg concentrations in edible and non-edible mushrooms revealed that many fungi are bioaccumulating remarkable amounts of Hg even at low environment Hg concentration in the soil [16–20]. In the terrestrial environment, fungi are the higher bioaccumulating organisms for Hg. Indeed, among various components of the forest ecosystem, ectomycorrhizal fungi contain the highest amount of Hg [21] and litter decomposing mushrooms accumulates Hg and MeHg in higher concentrations than any other fungi [22]. However, so far, remarkably little is known about fungal mechanisms that lead to Hg accumulation and sequestration.

It has been shown that fungal communities were less sensitive to Hg than bacterial communities in the soil [23, 24]. In general, fungi showed TE resistances at far superior ranges than bacteria [25] but understanding TE resistance very often first requires a description of the mechanisms involved in ion uptake into the cells. Interactions between fungi and other (non Hg) TE have been extensively studied and are related to extracellular precipitation, intracellular sequestration and biosorption to cell wall [26–29]. Those mechanisms involved phytochelatin, metallothionein and glutathione (GSH), as chelators [30–32], superoxide dismutase or thiol compounds [33]. In the fungal kingdom it has been assumed that accumulation and transport of Hg could depend on production of thiols, proteins rich in cysteine with sulfhydryl (-SH) groups. Indeed it has been proven that there is a strong correlation between the amounts of -SH groups of fungal proteins and Hg content in fungi (*Agaricus*), while almost no correlation for other metals like Cd, Al, Cu, Mn, Fe and Zn were found [34]. Moreover, the thiolate-Hg

complexation is capital because the number of thiolates ligated to Hg influenced his bound to carbon [35].

Most of our knowledge concerning TE uptake into the cell and compartmentation mechanisms is based on studies with easily cultivable yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae*. The biosorption potential of *S. cerevisiae* has been previously reviewed but is not fully understood [36]. Nonetheless, several factors are determinant for ion biosorption such as the status of biomass (living or non-living), types of biomaterials, properties of metal-solution chemistry, or environmental conditions such as pH [36]. Research has focused on transport of cations in *S. cerevisiae* and several proteins have been associated to TE transport in yeast and studies are available in the website of *Saccharomyces* Genome Database (SGD, <https://www.yeastgenome.org/go/GO:0006812>). For example, PCA1 is a Cd transporting P-type ATPase and may also have a role in Cu and Fe homeostasis [37]. The CCC2 protein is a Cu(+2)-transporting P-type ATPase system required for export of Cu from the cytosol into an extra-cytosolic compartment [38]. The GeneX/2 genes encode plasma membrane proteins controlling Metal<sup>2+</sup> homeostasis in *S. cerevisiae* [39, 40].

In this study we aimed at studying the Hg transport mechanisms by exploring the role of cation transport systems for Hg uptake and tolerance in *S. cerevisiae* (wild type and mutant strains) and in the higher fungus *Podospora anserina*. After a first screening, we focused on the genes GeneX/2 coding for a plasma membrane protein controlling Metal<sup>2+</sup> homeostasis in *S. cerevisiae*., also present in *Podospora anserina* as GeneX [41].

## Materials & Methods

### *Organisms and medium*

The mutant collection of *S. cerevisiae* BY4741 yeast were obtained at Euroscarf (<http://www.euroscarf.de/search.php?name=Order>) except for *S. cerevisiae* GeneX/2 deleted strain (*ScGeneX/2Δ*) obtain from the Department of Chemical Engineering from University of California [42]. The strains were grown in YPD medium (yeast extract 10 g, trypton 10 g, glucose 20g, pH 7) with required auxotrophic supplementation for each mutants and all yeast strains used in this work are listed in table 1. Strains were stored in YPD-glycerol (50% v:v) at 0.6 OD at -80 °C. We used a phosphate buffer for cell washing (PBS: NaCl 8 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g per liter, pH 7.2) and a minimal medium design for *S. cerevisiae* as following for one liter at pH 7 : glucose 20 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, MgCl<sub>2</sub> 95.2 mg, NaCl 0.1 g, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g, 1 ml trace element solution (trace elements 1000×: Boric Acid 500 mg, CuSO<sub>4</sub> 5(H<sub>2</sub>O) 40 mg, KI 100 mg, FeCl<sub>3</sub> 200 mg, MnSO<sub>4</sub> 400 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 200 mg, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 400

mg), 1 ml vitamins solution (Vitamins 1000×: Pyridoxine HCl 400 mg, Thiamine HCl 400 mg, Riboflavin 200 mg, Biotin 2 mg, Ca-Panthitenate 400 mg, Folic Acid 2 mg, Inositol 2 g, Nicotinic Acid 400 mg, p-Aminobenzoic Acid 200 mg). Optical density (OD) was measured with a biophotometer at 595 nm (*BioPhotometer*, Eppendorf, Germany) or a 96-well plate biophotometer at OD 595 nm (rosys Anthos lit2, Bioadvance, Germany).

**Table1:** Collection strains *Saccharomyces cerevisiae* BY4741.

Strain (phenotype)	Fonction of deleted genes	Cation supplementation of YPD media for optimal growth
BY4741 ( <i>ScWT</i> )	/	/
BY4741 ( <i>ScAlr1/2Δ</i> )	Alr1 & Alr2: Mg transporters	100 mM MgCl <sub>2</sub>
BY4741 ( <i>ScTrk1/2Δ</i> )	Trk1 & Trk2 : high affinity K uptake system	/
BY4741 ( <i>ScMid1/CCh1Δ</i> )	Mid1 & CCh1: high affinity Ca channel	100 mM CaCl <sub>2</sub>
BY4741 ( <i>ScPho84/89Δ</i> )	Pho84: high affinity P transporter Pho89: Na <sup>+</sup> /Pi cotransporter	/
BY4741 ( <i>ScSmf1/2Δ</i> )	Smf1 & Smf2: broad specificity divalent and trivalent Mn transporter	200 μM MnCl <sub>2</sub>
BY4741 ( <i>ScCtr1/3Δ</i> )	Ctr1: high affinity Cu uptake Ctr3: high affinity Cu uptake	500 μM CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O
BY4741 ( <i>ScZrt1/2Δ</i> )	Zrt1: high affinity zinc uptake Zrt2: low affinity zinc uptake	500 μM ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O
BY4741 ( <i>ScFtr1/Fet3Δ</i> )	Ftr1: high affinity Fe uptake system Fet3: Ftr1/associated Fe oxidoreductase	500 μM FeCl <sub>3</sub>
BY4741 ( <i>ScFtr1/Fet4Δ</i> )	Ftr1: high affinity Fe uptake system Fet4: low affinity Fe uptake system	500 μM FeCl <sub>3</sub>
BY4741 ( <i>ScFet3/4Δ</i> )	Fet3: Ftr1/associated Fe oxidoreductase Fet4: low affinity Fe uptake system	500 μM FeCl <sub>3</sub>
BY4741 ( <i>ScFtr1Δ</i> )	Ftr1: high affinity Fe uptake system	500 μM FeCl <sub>3</sub>
BY4741 ( <i>ScFet3Δ</i> )	Ftr1/associated Fe oxidoreductase	500 μM FeCl <sub>3</sub>
BY4741 ( <i>ScFet4Δ</i> )	Fet4: low affinity Fe uptake system	500 μM FeCl <sub>3</sub>

The three strains of *Podospora anserina* were obtained from the Institute of Genetic and Microbiology from University Paris Sud [41]: the wild type strain (*PaWT*); the deleted strain (*PaGeneX<sup>d</sup>*) and the complemented strain (*PaGeneX<sup>d</sup>[PaGeneX<sup>+</sup>]*). The fungi were initially grown in malt agar (12 g malt extract, 15 g agar per liter, pH 4.5) then maintained in Petri dishes by successive transfers on M2 agar medium with dextrin (pH 4.5) as previously described [43]. We used PBS for mycelium washing.

### **Growth of *S. cerevisiae* under Hg stress**

The wild type strain from stock solutions were incubated in YPD during 16 h at 27 °C at 200 rpm then yeast suspension was adjust to 0.05 OD<sub>600</sub> and transferred onto a 96-well plate (NunclonTMDelta Surface, Thermo Scientific, Danemark) to be incubated in YPD enriched with a gradient of HgCl<sub>2</sub> from 368 down to 0 μM to determine the range of Hg toxicity in our experimental conditions. In parallel, yeast suspensions of *ScWT* strain were incubated in YPD with both gradient of HgCl<sub>2</sub> and cations in the medium. Briefly, the HgCl<sub>2</sub> gradient followed

those concentrations: 0, 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2$  gradient followed those concentrations: 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1000  $\mu\text{M}$ ; and  $\text{KCl}$ ,  $\text{MetalCl}_2$  gradient followed those concentrations: 0, 50, 100, 150, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320 and 340 mM. The *ScWT* strain suspensions were adjusted to 0.05  $\text{OD}_{595}$  then transferred in 96-well plates for incubation in YPD with the previously mentioned gradient Hg and cations. The growth of the strain was estimated after 16 h of incubation in the dark without agitation at 27 °C. Additional tests were performed to compare growth of *ScWT* strain and the deleted strain *ScGeneX/2A* with gradient of  $\text{HgCl}_2$  (0, 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112  $\mu\text{M}$ ) and  $\text{ionCl}_2$  (0, 20, 40, 60, 80, 100 mM).

### ***Uptake of Hg by S. cerevisiae strains***

Pre-cultures of *S. cerevisiae* strains were carried out in YPD medium supplemented with cations to complement their nutritional needs as shown in table 1. The *ScWT* strain was also grown in those complemented medium to proceed in the same environmental conditions. Incubations were performed during 16 h at 30°C at 200 rpm then yeast suspensions were washed three times with the minimal medium. Next, the cultures were adjusted to 0.8 OD in minimal medium enriched with 10  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  and were incubated at 27 °C at 200 rpm for 4 h. Each deleted strain was compared to the wild type grown in the same condition. At the end of the incubation period yeasts were washed three times with PBS then yeast suspensions were serial diluted in PBS and the dilutions ( $10^{-3}$   $10^{-5}$ ) were used for the determination of the number of cultivable yeast (i.e., number of colony forming unit (CFU)) by spreading them onto YPD agar supplemented with the appropriate cations. Three replicates of each dilution were prepared and the plates were incubated in the dark at 27° C for 48 h to finally determinate the  $\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$  of yeasts suspensions. In parallel, the measure of total Hg (THg) in yeast suspensions were performed with an AMA-254 cold vapor atomic absorption (CV-AAS) Hg analyzer (Altec Co., Czech Republic), using the standard conditions recommended by the manufacturer (120 s drying, 150 s heating, 45 s cooling). The validity of the analytical method was checked using the certified reference material (CRM) Oriental Basma Tobacco Leaves (INCT-OBTL-5), with a certified Hg content of  $20.9 \pm 1.3$  ng/g DM [44], and quality controls were regularly performed as described elsewhere [45]. Moreover, a measure of THg in the supernatant was performed to control the quality of PBS washing. In addition, experiments following the same protocol were performed to compare the Hg uptake of *ScWT* and *ScGeneX/2A* strains, with  $\text{HgCl}_2$  gradient setup at the following concentration: 0, 32 and 48  $\mu\text{M}$ ; and  $\text{ionCl}_2$  gradient at those concentrations: 0, 50 and 100 mM.

### ***Growth and Hg uptake of *P. anserina* strains under HgCl<sub>2</sub> pressure***

The deleted fungi *PaGeneX1* was capable of growth without the addition of ion in the medium but showed latency of 4 d compared to the two other strains. Thus, growth of *PaGeneX1* was started 4 d before the other strains. Mycelia were pre-incubated for two wk at 23 °C in the dark on M2 agar medium and at the end of the incubation period 0.5 cm mycelium discs were used for experiments. To evaluate the Hg resistance and Hg uptake capacity of the 3 *P. anserina* strains, discs of mycelium (3 replicates) were exposed to increasing HgCl<sub>2</sub> concentrations in 1 ml M2 as followed: 0, 5, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175 and 200 µM HgCl<sub>2</sub>. Incubation were performed during 10 d at 23 °C in the dark without agitation. At the end of the Hg exposure period, fungal Hg uptake rates were measured for the lower HgCl<sub>2</sub> concentrations, from 0 up to 30 µM. In parallel, mycelium discs were transferred in 6-well plates (18 replications for each strain) and incubated during 8 d at 23 °C in the dark in 4 ml of liquid M2 medium enriched with 10 µM HgCl<sub>2</sub>. At the end of the Hg exposure period mycelia were washed 3 times with PBS, dry at ambient temperature during 5 d, then ground into powders that were diluted in distilled water before THg measurement using the AMA-254.

### ***Effect of metabolic inhibitors on Hg uptake in *P. anserina* and time course of Hg desorption from mycelia***

An experiment was design to compare Hg uptake by *P. anserina* using various metabolic inhibitors. The *PaWT* strain was pre-incubated for a wk at 23 °C in the dark on M2 agar medium then mycelium discs were transferred in M2 liquid medium (40 ml) and incubated during 10 d at 23 °C in the dark before the addition of both 10 µM HgCl<sub>2</sub> and the tested inhibitor: carbonyl cyanide m-chlorophenyldrazone (CCCP) 10µM, 2,4-dinitrophénol (DNP) 10 µM , and hexamine(III) cobalt chloride (HCC) 20 µM, control treatments consisting of the use of the same strains and conditions without inhibitors. The fungi were incubated with Hg and inhibitors during 16 h in the dark without agitation at 23 °C. Low temperature exposure assay consist of incubation for 16 h in the dark without agitation at 4 °C.

Another experiment was carried out to monitored Hg subcellular compartmentation using a previously described method [27] implying measurements of the desorption rate of Hg from the mycelium of *P. anserina*. *PaWT* strain was pre-incubated for one wk at 23 °C in the dark on M2 agar medium then mycelium discs were transferred in 40 ml M2 liquid medium and incubated during two wk at 23 °C in the dark. The mycelium was recover, briefly washed with PBS and transferred in a Hg-contaminated solution containing CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM, MES 2 mM and 10 µM HgCl<sub>2</sub> (pH 4.5) for 30 min or 16 h. After the exposure periods, mycelium was briefly



rinsed with the previous solution without Hg then transferred in the desorption solution containing CaCl<sub>2</sub> 5 mM and MES (pH 4.5) 2mM. During the monitoring of desorption samples were maintained at low temperature (4°C) to avoid re-uptake of Hg. Aliquots of the desorption solution were sampled at various intervals of times to monitored desorption of Hg for 10 h using an AMA-254. The mycelium was recovered at the end of desorption period to measure Hg amount remaining. A second experiment following the Hg desorption rate of *Pa*WT strain exposed to Hg with or without the addition of HCC during the exposure period was carried out. Hg-contaminated solution was containing CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM, MES 2 mM and HgCl<sub>2</sub> (pH 4.5) 6.25 µM with or without the addition of HCC 12.5 µM. After 16h of exposure the same procedure was followed: i) the mycelium was transferred into the desorption solution, ii) aliquots of desorption solution were sampled for 10 h, and iii) the mycelium was recovered. At the end of the Hg exposure period, mycelia and liquid samples were treated as previously mentioned for THg measurement.

#### ***Hg binding to thiols in P. anserina***

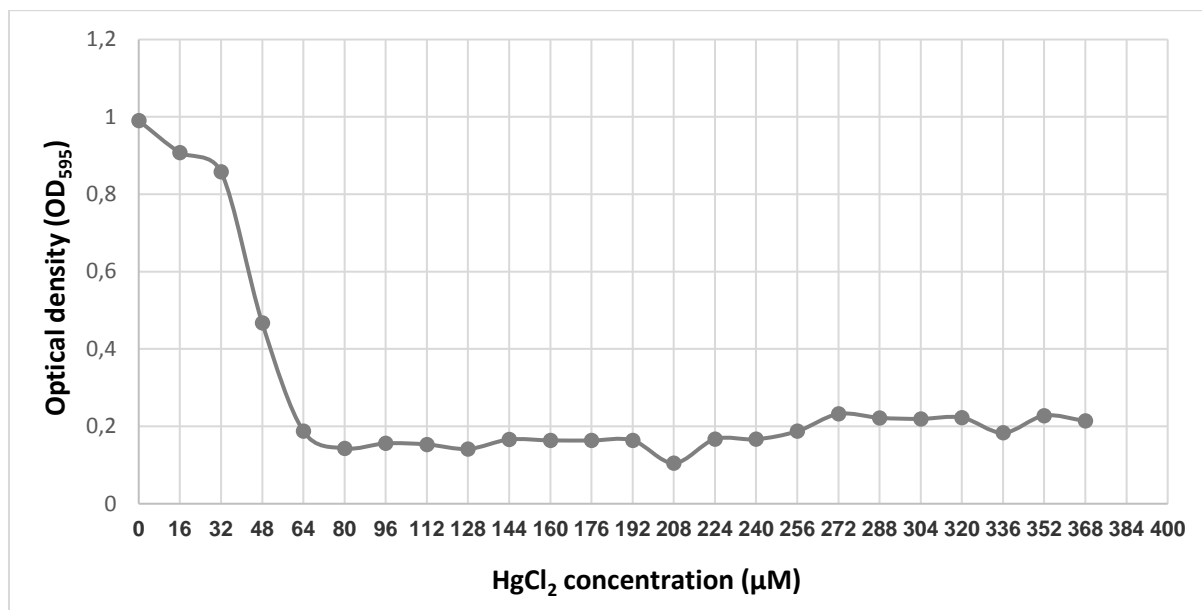
Hg binding to thiolates in the proteins of *P. anserina* was tested using a laboratory made protocol inspired by previous works [46]. Briefly, *Pa*WT strain was incubated 20 d in M2 medium in the dark without agitation at 23 °C then was exposed in this medium to HgCl<sub>2</sub> 10 µM during 16 h. Mycelia were recovered, briefly washed with PBS then ground in a Tris-HCl buffer (pH 8.5) at 4°C containing Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 2 mM and Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) 0.1 %. Extracts were agitated 15 min, exposed to ultrasound 20 min, centrifuged at 30,000 g for 10 min and filtrated at 22 µm. For proteins precipitation, the reaction was produced by mixing a solution trichloroacetic acid acetone 10% with the protein extract in equal proportions. Hg concentration in the pellet of protein and in the supernatant was compared in the presence or absence of 2 mM 1,4-dithiothréitol (DTT). DTT reduced thiols compounds avoiding cysteine group oxidation in those proteins, and *de facto* releasing Hg bound to thiols.

#### ***Statistical analysis***

The Shapiro test and the Bartlett test were used to check the normality and homoscedasticity of the data, respectively. Our data verifying normality and homoscedasticity were assessed using analysis of variance (ANOVA). In other cases the data were examined using the Kruskal-Wallis test. Statistical analyses were performed with R software, version 3.3.2 [47].

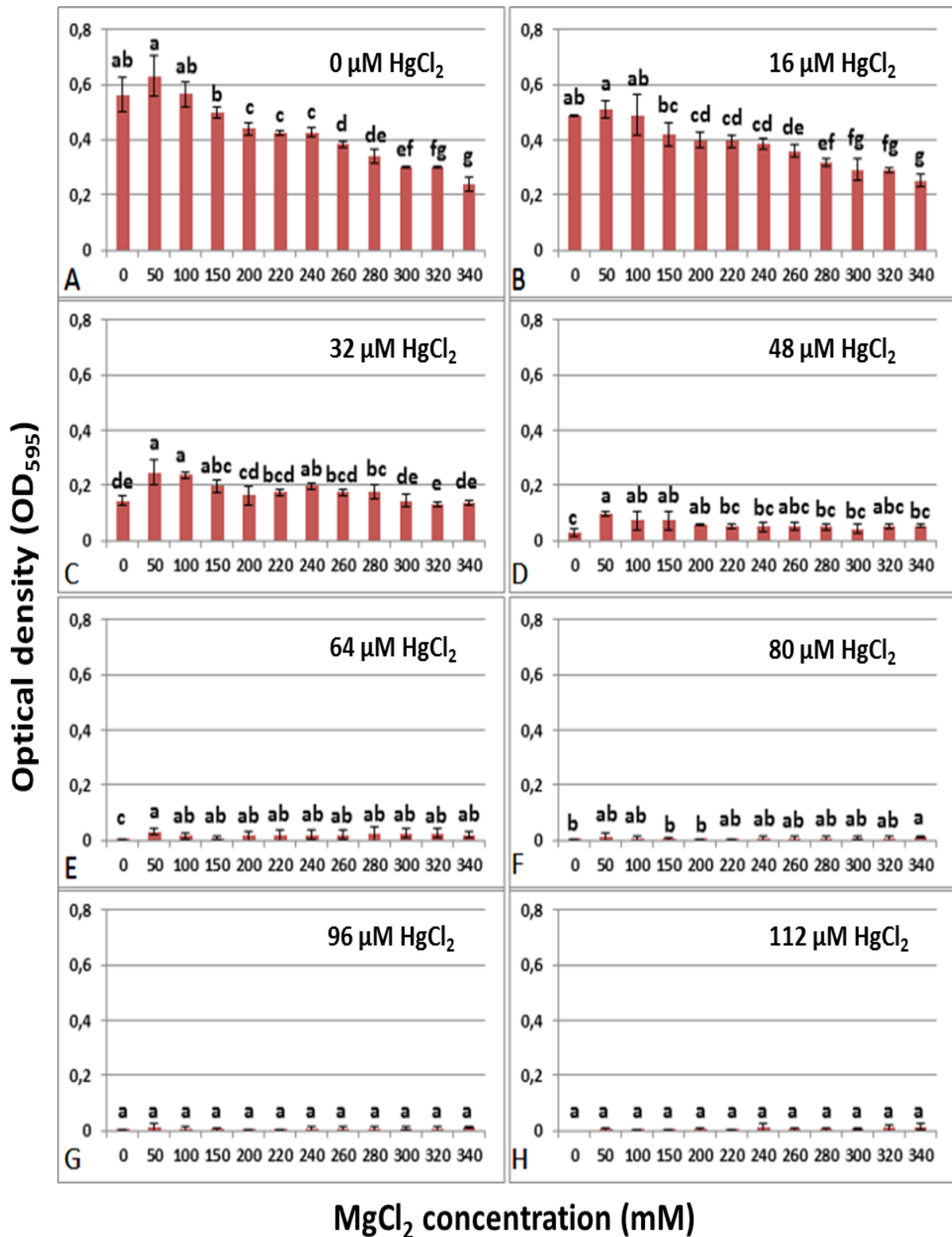
## Results & Discussion

### Impact of Hg on growth of *S. cerevisiae*



**Figure 1:** Hg tolerance of *ScWT*. Incubation was carried out in YPD medium during 16 h at 27 °C at 200 rpm in the dark.

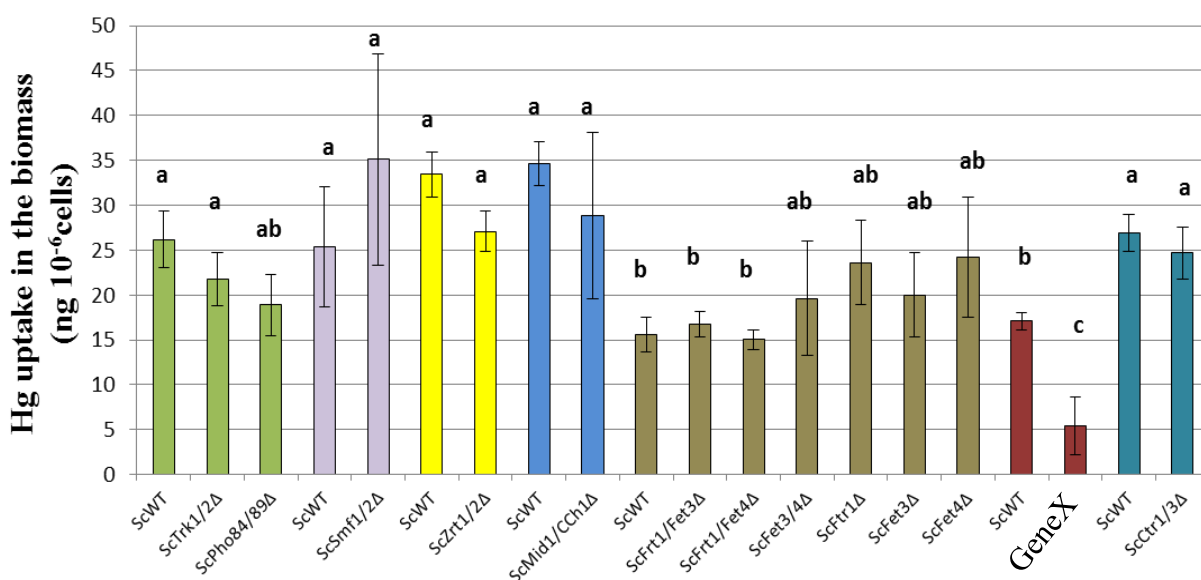
Our tests revealed that the growth of wild type BY4741 in YPD was inhibited by HgCl<sub>2</sub> exposure, reaching half maximal effective concentration (EC<sub>50</sub>) around 48 µM and a minimum inhibitory concentration (MIC) value of 64 µM (Fig. 1). A previous study on *S. cerevisiae* strain AOY1 possessing the three DNA repair systems: excision repair, mutation repair, and recombination repair, showed an EC<sub>50</sub> of 192 µM HgCl<sub>2</sub>, while a recombination repair-deficient mutant showed an EC<sub>50</sub> of 56.9 µM [48]. Our results are more closely related to the recombination repair-deficient mutant strains; however our strains are not isogenic and the tolerance could be strain dependent. This study also showed that among the four inorganic Hg forms tested: HgCl<sub>2</sub>, HgSO<sub>4</sub>, Hg(NO<sub>3</sub>) and Hg<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>); HgCl<sub>2</sub> showed less toxicity. Furthermore, our results revealed that growth medium supplementation with most of the tested cations such as Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> did not improved the Hg-tolerance of the wild type strain, in fact, several of these metals were toxic for the strain at concentration lower than 150 µM (data not showed). However, Ion increased significantly *S. cerevisiae* growth in Hg enriched medium in several conditions with an optimum increase when exposed to 32 µM HgCl<sub>2</sub> and 50 mM IonCl<sub>2</sub> (Fig. 2), though Mg showed toxicity for *ScWT* when exceeding 200 mM IonCl<sub>2</sub>.



**Figure 2:** Hg tolerance of *ScWT*. Incubation was carried out in YPD medium during 16 h at 27 °C at 200 rpm in the dark with various Hg/Ion ratios. In abscise IonCl<sub>2</sub> concentrations goes from 0 to 320 mM, while HgCl<sub>2</sub> concentrations were as followed: A (0), B (16), C (32), D (48), E (64), F (80), G (96) et H (112) μM. Standard deviation are indicated and different letters represents significant differences (p value < 0.05).

### *Ion transporter GeneX/2 as a major entry pathway for Hg uptake into S. cerevisiae*

Biosorption of Hg by *S. cerevisiae* is still a largely unknown mechanism and studies are scarce [36]. Thus, we performed a screening for Hg uptake capacities of various *S. cerevisiae* strains deleted for cation transport (Table 1) in comparison with the wild type strain BY4741 strains grown in the same conditions (Fig. 3).



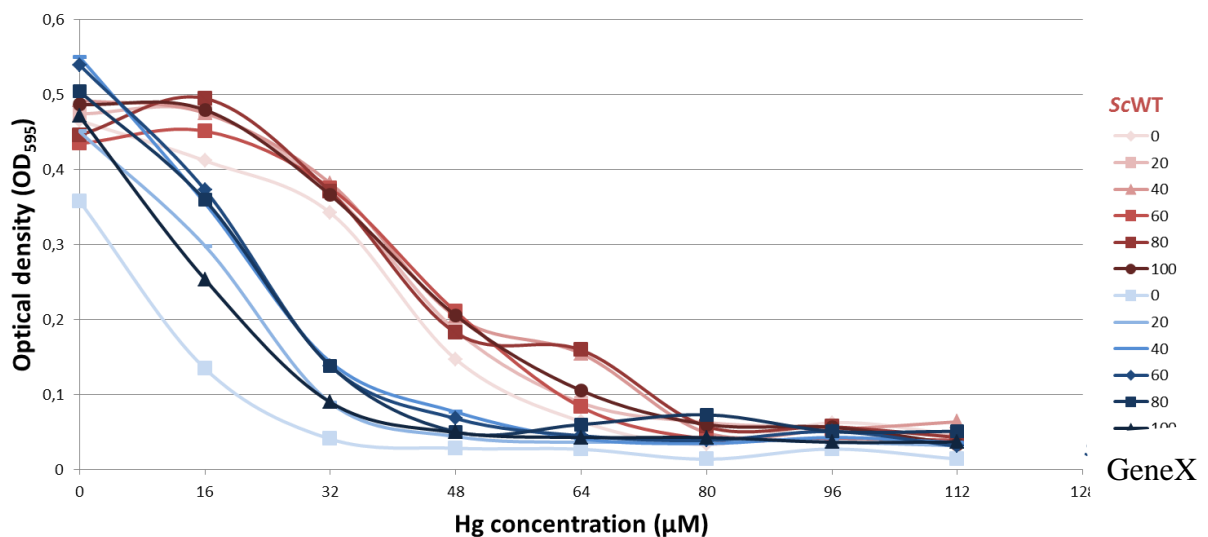
**Figure 3:** Hg uptake of wild type and deleted strains after 4 h of exposure to 10 μM HgCl<sub>2</sub> in minimal medium. Different colors signify different pre-culture conditions. Standard deviations are indicated and different letters represents significant differences (p value < 0.05).

GeneX While adding Ion<sup>2+</sup> and other cations in solution, Cl<sup>-</sup> ions were also added, and a previous study showed that chloride at high concentrations strongly increases the Hg(II) binding efficiency to *S. cerevisiae* free cells [49]. Thus the use of IonCl<sub>2</sub> or other forms of Ion such as IonSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O at high concentration could have changed the growth and uptake results. We have tested this hypothesis and did not find significant differences between those two forms of Ion (data not shown). Moreover, we used CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> and FeCl<sub>3</sub> compounds and did not find significant increase of uptake or decrease of growth in our experimental conditions.

Our results showed that addition of IonCl<sub>2</sub> and FeCl<sub>3</sub> in the pre-culture medium significantly (*p* value = 0.04) decreased Hg<sup>2+</sup> uptake for the ScWT strain, despite the fact that exposures were made in a minimal medium without any cation addition. This effect was observed after washing of the yeast cells, which could imply that the yeast cells have made stock of those essential cations during pre-culture and may lead to a decrease of the Ion and Fe transport activity after the pre-culture step. Thereby, it may be possible that Fe and Ion in high concentrations inhibited several plasma membrane transporter gene expression leading to a decrease of Hg uptake. Indeed, it has been previously showed that the *mnr2* mutation, which is

thought to inhibit release of vacuolar-stored Ion, was associated with an increased GeneX activity, suggesting that GeneX gene was regulated by intracellular Ion supply [40, 50]. All the strains carrying deletion for Fe transporters did not significantly less accumulates Hg than ScWT cultured in the same conditions (Fig. 3 in brown). Conversely the ScGeneX/2Δ strain accumulates around 3 times less Hg than the wild type (p-value = 0.003) (Fig. 3 in red). This corroborates the previous sign of competition between Hg<sup>2+</sup> and Ion<sup>2+</sup> and could imply a transport of Hg through Ion transport system GeneX/2.

Further investigations were carried out to compare Hg-tolerance of the wild type strain compared to ScGeneX/2Δ strain with various amounts of Ion<sup>2+</sup> added to the YPD medium (Fig. 4). The hypothesis was that deletion of Ion transporter GeneX/2 would alleviate the Hg stress as Hg<sup>2+</sup> ions would not enter the cells.

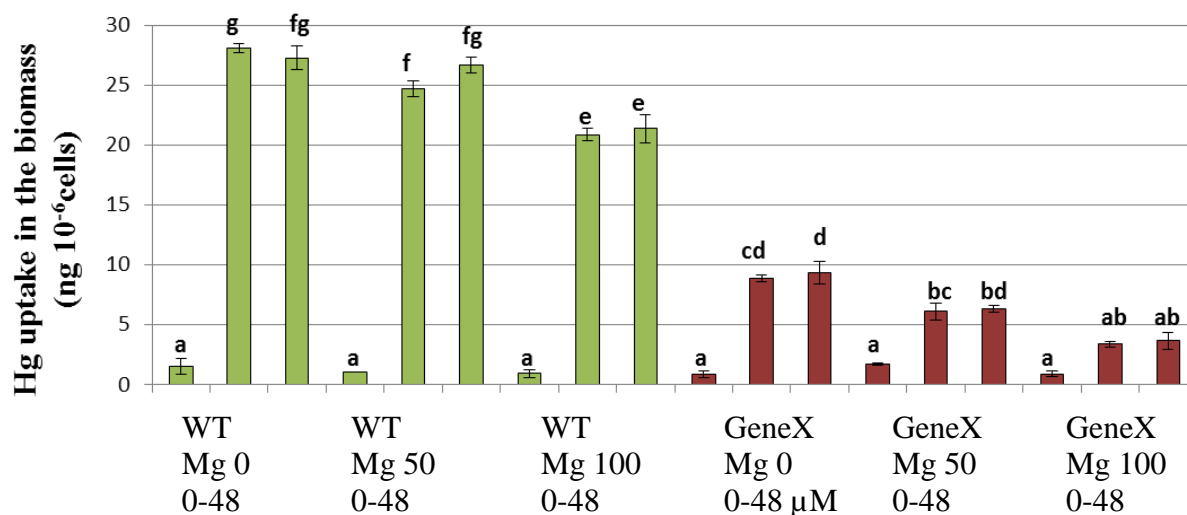


**Figure 4:** Hg tolerance of ScWT and ScGeneX/2Δ. Incubation was carried out in YPD medium during 16 h at 27 °C at 200 rpm in the dark with various Hg<sup>2+</sup>/Ion<sup>2+</sup> ratios.

This data corroborated our previous results showing the increase of HgCl<sub>2</sub> tolerance by addition of Ion<sup>2+</sup> ions in the medium for both strains. However, the expected increase of Hg tolerance of the ScGeneX/2Δ was not evidenced, when compared with the wild type strain BY4741. Globally, we found a decrease of growth rate for ScGeneX/2Δ due to the deletion and we were not able to find optimal conditions to compare Hg tolerance of the two strains. Classical genetics and large scale survey revealed that the strains ScGeneX/2Δ grow very slowly; show decreased competitive fitness [42], increased sensitivity to several chemicals such as microtubule-destabilizing agent benomyl [51]. Thus we did not reach accurate conclusion with our experiment, however, it was previously revealed that overexpression of GeneX/2 genes in *S. cerevisiae* did change tolerance for several metals [52]. In detail, they showed that the

overexpression of *GeneX/2* genes increased tolerance to  $Al^{3+}$  and  $Ga^{3+}$  but conversely increased sensitivity to  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $la^{3+}$  ions. Hg was included in that study.

Additional experiments confirmed that *GeneX/2* expression and  $IonCl_2$  concentrations in the Hg exposure medium were associated to the Hg uptake capacity of *S. cerevisiae* (Fig. 5).



**Figure 5:** Hg uptake of *ScWT* (green) and *ScGeneX/2<sup>Δ</sup>* (red) strains after 4 h of exposure to 0, 32 or 48  $\mu M$   $HgCl_2$  and 0, 50, 100 mM  $IonCl_2$  in minimal medium. Different letters represents significant differences (p value < 0.05). Standard deviations are indicated.

The data showed a significant decrease of Hg uptake in all assays using *GeneX/2* deletions; in the same conditions deleted strains accumulate 3 to 4 times less Hg than the *ScWT* strain. Those results are in agreement with previous works on *S. cerevisiae* showing that the *GeneX* transporter also showed some affinity for other divalent cations such as  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  and  $Co^{2+}$  [50]. Moreover, those authors also revealed a decrease of Ni uptake while adding 0.1 to 10 mM  $IonCl_2$  in the exposure medium. They concluded that elevated Ion concentrations decreased *GeneX* expression and thus  $Ni^{2+}$  uptake. In our dataset, high concentrations of  $IonCl_2$  (50 and 100 mM) in Hg exposure medium did not decreased the Hg uptake as much as the *GeneX/2* deletion; while  $IonCl_2$  in Hg exposure medium decreased Hg uptake for both *ScWT* (expected) and *ScGeneX/2<sup>Δ</sup>* (unexpected). This suggests that: i) high concentrations of  $IonCl_2$  cannot fully inactivate *GeneX/2* expression in our experimental conditions and ii)  $IonCl_2$  may affect other Hg entry systems than just *GeneX* transporters. Mechanisms for accumulation of metals in the cells probably involve transport regulation at different sites within the mycelium, including binding to the cell walls, uptake across the plasma membrane and uptake across internal membranes such as the tonoplast [27]. In addition, at the end of the 4 h exposure period

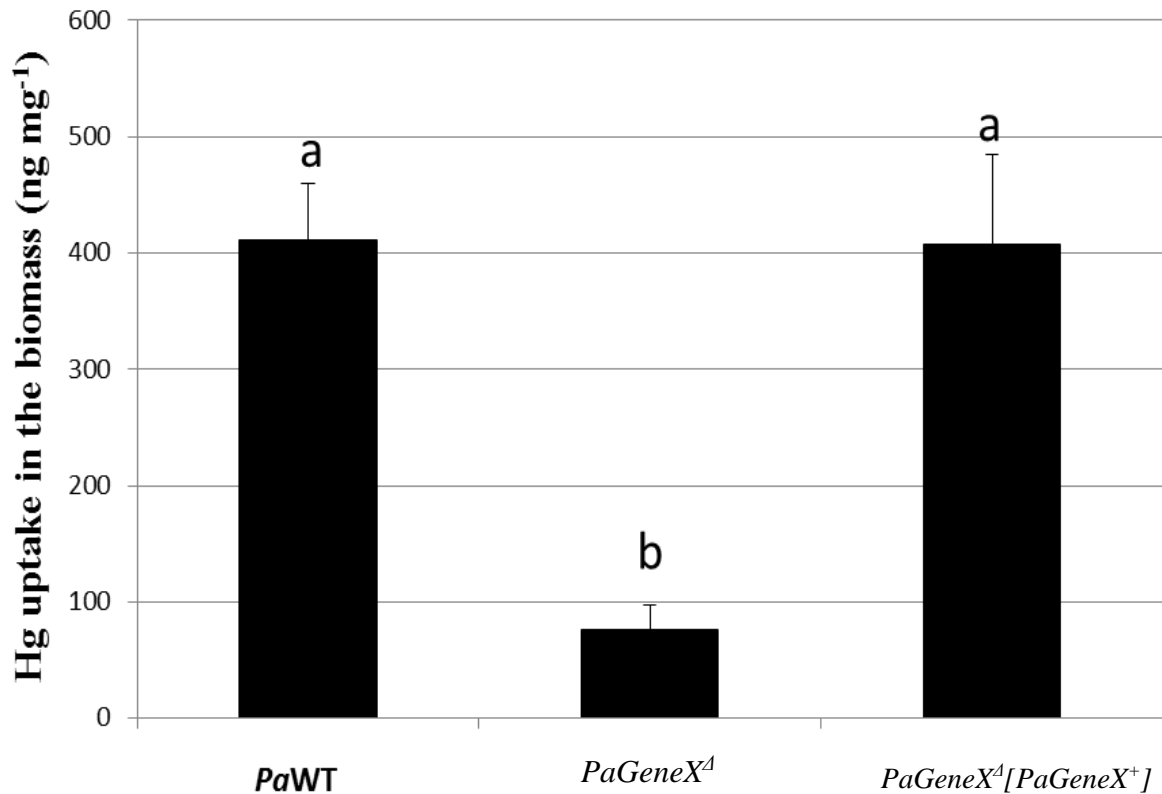
we did not find any significant variations between Hg uptakes by the fungal cells at 32 and 48  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  in medium. Corroborating this result, it has previously been shown that  $\text{Hg}^{2+}$  ions in solution have a low affinity for *S. cerevisiae* cells . shown that  $\text{Hg}^{2+}$  ions in solution have a low affinity for *S. cerevisiae* cells [49].

**Effect of GeneX deletion on Hg uptake and resistance in Podospora anserina**

*P. anserina* as filamentous fungi was studied to test the hypothesis that the gene *PaGeneX* homologous to *S. cerevisiae GeneX/2* was also associated with Hg uptake. Determination of *P. anserina* MIC values for Hg revealed that *PaGeneX<sup>Δ</sup>* showed a slightly higher tolerance to  $\text{HgCl}_2$  exposure than *PaWT* and *PaGeneX<sup>Δ</sup>[PaGeneX<sup>+</sup>]*, accumulating much lower amounts of Hg (Table 2). Additional experiments with a higher number of replicates confirmed that Hg uptake by *P. anserina* was *PaGeneX* gene expression dependent (Fig. 6).

**Table2:** MIC and Hg uptake of the 3 *P. anserina* strains after 10 days of incubation in 1 ml M2 at 23 °C without agitation in the dark. Standard deviation are indicated between brackets and different letters represent significant differences (p value <0.05).

HgCl <sub>2</sub> (μM)	<i>PaWT</i>		<i>PaGeneX<sup>Δ</sup></i>		<i>PaGeneX<sup>Δ</sup>[PaGeneX<sup>+</sup>]</i>	
	Growth	Hg (ng mg <sup>-1</sup> )	Growth	Hg (ng mg <sup>-1</sup> )	Growth	Hg (ng mg <sup>-1</sup> )
0	+	4.6 (± 1.9) <sup>a</sup>	+	5.1 (± 1.5) <sup>a</sup>	+	4.1 (± 0.7) <sup>a</sup>
5	+	184.4 (± 35.7) <sup>bc</sup>	+	46.4 (± 17.8) <sup>ab</sup>	+	206.6 (± 30.3) <sup>bc</sup>
10	+	384.7 (± 113.9) <sup>cd</sup>	+	162.0 (± 63.5) <sup>bc</sup>	+	351.0 (± 15.5) <sup>bcd</sup>
20	+	414.6 (± 61.4) <sup>cd</sup>	+	126.5 (± 14.3) <sup>bc</sup>	+	454.0 (± 50.6) <sup>cd</sup>
30	+	562.5 (± 172.5) <sup>d</sup>	+	247.5 (± 72.2) <sup>bcd</sup>	+	545.5 (± 34.0) <sup>d</sup>
50	+	ND	+	ND	+	ND
75	+	ND	+	ND	+	ND
100	-	ND	+	ND	-	ND
125	-	ND	-	ND	-	ND
150	-	ND	-	ND	-	ND
175	-	ND	-	ND	-	ND
200	-	ND	-	ND	-	ND



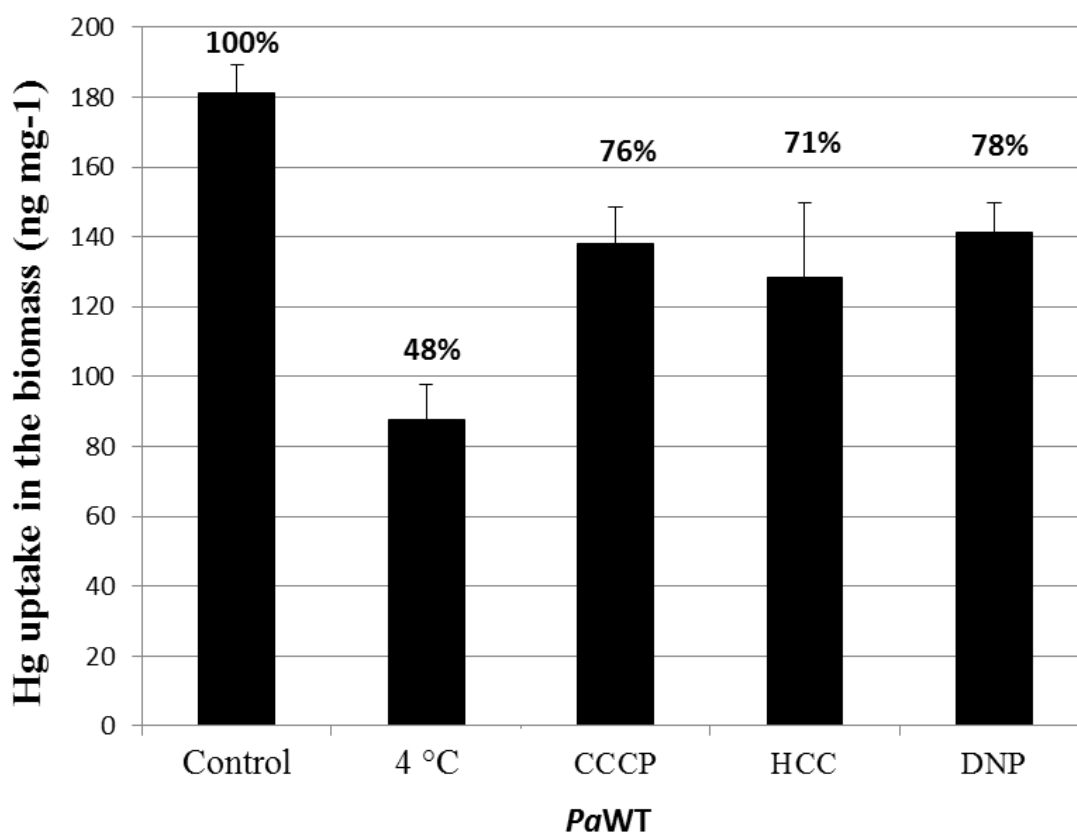
**Figure 6:** Hg uptake of *P. anserina* strains after 8 d of incubation into 4 ml M2 medium at 23 °C without agitation in the dark enriched with 10 μM HgCl<sub>2</sub>. Standard deviation are indicated and different letters represent significant differences (p value <0.05).

*P. anserina* MIC values are higher than the *S. cerevisiae* MIC values, indeed, in the experimental conditions *PaWT* showed the same tolerance that *PaGeneX<sup>Δ</sup>[PaGeneX<sup>+</sup>]* strain to HgCl<sub>2</sub> exposure with a MIC of 75 μM, while *PaGeneX<sup>Δ</sup>* showed a MIC value of 100 μM (Table 2). Moreover, our data indicated that *PaGeneX<sup>Δ</sup>* strain had a 4 to 5 fold lower Hg uptake when exposed to 10 μM of Hg during 8 d when compared with both *PaWT* and *PaGeneX<sup>Δ</sup>[PaGeneX<sup>+</sup>]*(Fig. 6). On the other hand, the complemented strain *PaGeneX<sup>Δ</sup>[PaGeneX<sup>+</sup>]* had a Hg uptake rate very similar to the *PaWT* strain, indicating that *GeneX* gene expression is also contributing to Hg uptake in this higher fungus (Figure 6). The concentrations measured in the mycelium of *P. anserina* were significantly greater than the concentrations found in *S. cerevisiae* yeast. *P. anserina* were incubated for 8 d in the contaminated growth medium whereas *S. cerevisiae* was exposed only 4 h, which could lead to those variations of accumulation.

#### ***Low temperature and transport inhibitors decreased Hg uptake in P. anserina***

Various inhibitors which are known to decrease some transporter activities were tested on *P. anserina* while Hg uptake rates by the mycelium were measured (Figure 7).





**Figure 7:** Hg uptake rates by *PaWT* strain after 16 h of incubation into 40 ml M2 medium without agitation in the dark enriched with 10  $\mu$ M HgCl<sub>2</sub>. Percentage are relative to the control growing at 23°C without inhibitory activities. CCCP: Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (20 $\mu$ M), HCC: hexamine(III) cobalt chloride (20 $\mu$ M) and DNP: 2,4-dinitrophénol (10 $\mu$ M). Standard deviations are indicated.

The cold treatment (4°C) was the most effective treatment that led to a decrease of Hg in the *PaWT* strain, with a 2-fold reduction when compared to the control (Fig. 7). Low temperatures are known to reduce divalent cations uptake by fungi [53], as confirmed for the uptake of Cd by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* [27], Cu [54], Co, Cd [55] by *S. cerevisiae* suggesting that accumulation may be a metabolic dependent process. The protonophore CCCP induced a decrease of Hg uptake in *PaWT* strain by 24% which is in agreement with previous studies showing that transport of divalent cations was dependent on the membrane potential in yeast cells while H<sup>+</sup> may be considered as a counter ion [27, 55]. However, inhibition by CCCP is limited, suggesting that other Hg uptake mechanisms may play a role. In addition, DNP (an uncoupler of oxidative phosphorylation) decrease Hg uptake up to 22% corroborating works on *Mytilus edulis* which showed a significant decrease of Hg uptake rate compared to the control for both DNP and potassium cyanide inhibitors [56]. In this paper the author suggested that Hg uptake may be coupled with active transport, possibly through competition with cations such as Ca<sup>2+</sup> which are taken up via carrier-mediated, active transport,

which we did not evidence in our set of data.. We further used HCC (a CorA Ion<sup>2+</sup> transport inhibitor) [57] and revealed up to 29% decrease of Hg uptake confirming that the plasma membrane Ion transporter may play a role in Hg uptake. However, HCC as other inhibitors tested inhibit only partially Hg uptake suggesting multiple pathways for Hg entry into fungal cells.

**Hg repartition in subcellular compartment in *P. anserina* and Hg-thiolate binding potential**

To determine the subcellular compartmentation of Hg in *P. anserina*, time-dependent kinetic desorption of Hg from the mycelia were monitored (Table 2 and Fig. S1).

**Table2:** Intracellular Hg compartmentation in *Pa*WT mycelia. A: in a short-term (30 min) and long term (16 h) exposure to 10 μM HgCl<sub>2</sub>, B: in long term (16h) exposure to 6.25 μM HgCl<sub>2</sub> with or without HCC inhibition (12.5 μM).

A. 30 min exposition period			
	Cell wall	Cytoplasm	Vacuole
Hg(ng)	204	158	85
Hg(ppm = ng/mg)	2,33	1,81	0,97
Hg (%)	46	35	19
16h exposition period			
	Cell wall	Cytoplasm	Vacuole
Hg(ng)	4632 (x22)	4536 (x28)	3854 (x45)
Hg(ppm = ng/mg)	57	56	48
Hg (%)	36	35	29

B. Exposition without HCC			
	Cell wall	Cytoplasm	Vacuole
Hg(ng)	1044	1322	947
Hg(ppm = ng/mg)	16	21	14
Hg (%)	32	40	28
Exposition with HCC			
	Cell wall	Cytoplasm	Vacuole
Hg(ng)	787 (75%)	602 (46%)	443 (47%)
Hg(ppm = ng/mg)	16	12	9
Hg (%)	43	33	24

For a short-term (30 min) and long term (16h) experiment and for a long kinetic with or without the inhibitor HCC (12.5 μM); efflux of Hg from the mycelia were converted in log data matching with a three phase model which could be related to three compartments dissected in series: the vacuole, cytoplasm and cell wall as previously showed [27]. Verification of the model was performed by applying kinetic analyses to the experimental data. As shown in Table 2, after a 30 min incubation of mycelia in Hg-uptake solution, the cell wall compartment represented 46% of the total Hg accumulated, whereas the cytoplasm and vacuole represented 35 and 19 % of the total Hg accumulated, respectively. None of the three cellular compartments

was saturated by Hg after 30 min incubation, as suggested by a 16 h exposure to HgCl<sub>2</sub> showing amount of Hg 22, 28 and 48 times higher in cell wall, cytoplasm and vacuole compartments, respectively (Table 2 A.). This results also corroborate the relatively low rate of HgCl<sub>2</sub> uptake in *S. cerevisiae* showed so far [49]. Moreover, a 16h exposure to Hg had changed the intracellular repartition of Hg compared to the short exposure. Indeed, after 16 h exposure the amount of Hg was nearly equally distributed among the three compartment (Table 2 A.). This experiment revealed Hg transport inside the cell with a cytoplasmic or vacuolar compartmentation.

In addition, the same experiment with the CorA Ion<sup>2+</sup> transport inhibitor HCC showed a decrease of Hg uptake in the three compartments, especially for cytoplasm (54%) and vacuole (53%) when compared to cell wall (25%). Furthermore, the HCC inhibitor changes the distribution of Hg among the three compartments decreasing the amount of Hg inside the cell (Table 2 B.). Since HCC is inhibiting CorA Ion<sup>2+</sup> plasma membrane transporter those results corroborates the hypothesis that Hg entry into fungal cells is mediated by a Ion transporter. The transport of Hg inside the vacuole seems also improved after a long exposure to HgCl<sub>2</sub> which is consistent with previous data on fungi showing vacuolar accumulation of several TE such as Cd, Zn and Ag [58] suggesting metal-thiolate binding by various molecules and especially metallothionein-like peptide [59].

**Table3:** Relative amount of Hg fixed to thiolate in the protein phase extracted from *P. anserina* mycelium exposed to 10 µM HgCl<sub>2</sub> during 16 h in M2 medium at 23°C in the dark without agitation.

Sample type	Amount of Hg (ng)	Relative amount of Hg (%)
Protein pellet (Total)	1810	100
Protein pellet (with DTT)	64	15.1 %
Supernatant (with DTT)	357	84.9 %
Protein pellet (without DTT)	278	65.2 %
Supernatant (without DTT)	148	34.8 %

To determine the proportion of Hg fixed to thiolate compounds inside the mycelium of *P. anserina* we used a DTT-based assay. We measured a decrease of Hg in the protein pellets when exposed to DTT when compared to non-exposed mycelia (Table 3). In details, data revealed that in the presence of DTT, the protein fraction released 84.9% of its Hg content in

the supernatant while only releasing only 34.8% without DTT. These data showed that Hg in the mycelium of *P. anserina* was in majority bound to sulfhydryl groups (-SH).

Recently, Hg speciation and ligand environment has been carried out on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) *Glomus sp.* and has revealed that AMF originating from a highly Hg polluted environment showed another Hg-S attachment that observed for an AMF originating from non-contaminated area [60]. Indeed, AMF from the non-contaminated area had 73–80% of Hg attached between two sulphur atoms while AMF originating from contaminated area had 21–26% Hg attached to four thiol groups. The authors concluded that AMF can modify Hg ligand environment in plant roots, thus playing an important role in biogeochemical cycling of Hg in terrestrial ecosystems.

## Conclusion

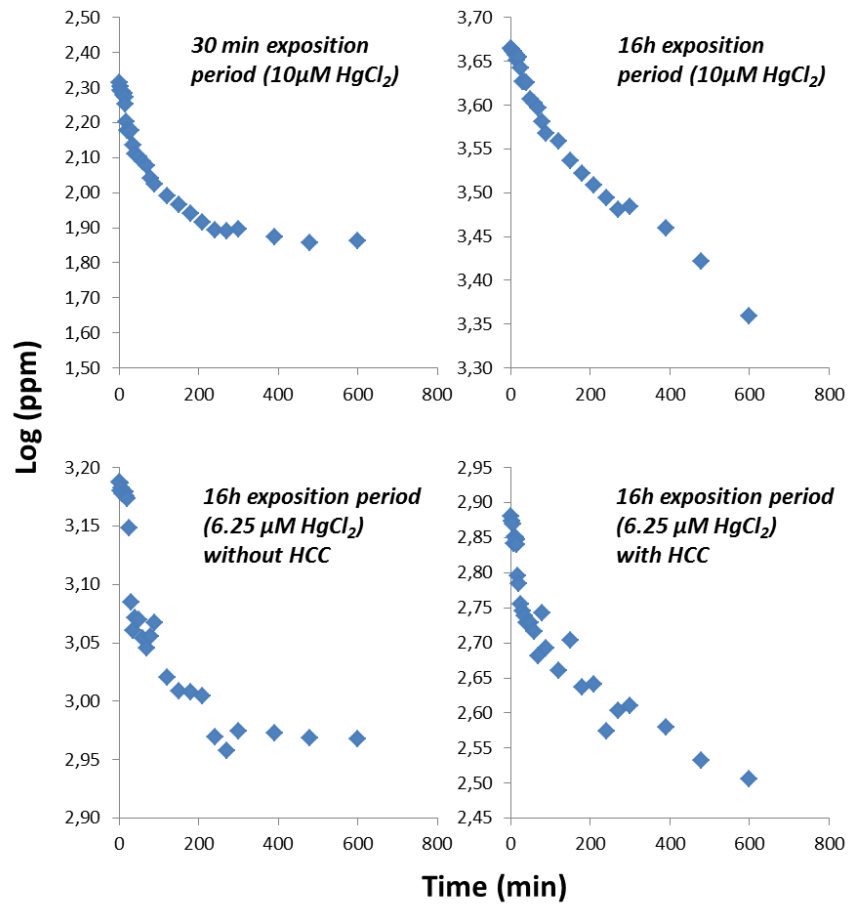
Hg-uptake and compartmentation in fungal cells may be of particular importance for understanding its impact in the biosphere in terrestrial environments. Indeed, it has been shown that fungi are accumulating the largest amount of Hg in forest ecosystem [21]; this accumulation of Hg is species dependent, and litter decomposing fungi are bioaccumulating higher concentration than ECM and wood decomposing fungi [22]. The present work demonstrates the ability of the two models fungus *S. cerevisiae* and *P. anserina* to take up and further accumulate Hg in different compartments. In the literature, information on the uptake or subcellular compartmentation of Hg in fungal cell is scarce. The present investigation revealed the Hg transport potential of GeneX/2 proteins coding for Ion plasma membrane transporter. These data represent a first step towards the understanding of the mechanisms underlying fungal Hg accumulation.

## Acknowledgments

This work was supported by the French Environment and Energy Management Agency [PROLIPHYT 1172C0053], the Région Franche-Comté [Environnement-Homme-Territoire 2014-069], the Pays de Montbéliard Agglomération [13/070-203-2015], and the French national programme EC2CO/MicrobiEen FREIDI-Hg. A.D. received a PhD grant from the Région Franche-Comté. V.A.L. received a post-doc grant from the Région Franche-Comté.

## Supporting Informations

The following Supporting Information is available for this article:



**Figure S1:** Hg remaining in *PaWT* mycelia expressed in Log(ppm) function of time (min) in the 4 experimental conditions.

## References

1. Crane S, Barkay T, Dighton J (2012) The effect of mercury on the establishment of *Pinus rigida* seedlings and the development of their ectomycorrhizal communities. *Fungal Ecol* 5:245–251. doi: 10.1016/j.funeco.2011.12.001
2. Liu YR, Wang JJ, Zheng YM, et al (2014) Patterns of Bacterial Diversity Along a Long-Term Mercury-Contaminated Gradient in the Paddy Soils. *Microb Ecol* 68:575–583. doi: 10.1007/s00248-014-0430-5
3. Campbell L, Verburg P, Dixon DG, Hecky RE (2008) Mercury biomagnification in the food web of Lake Tanganyika (Tanzania, East Africa). *Sci Total Environ* 402:184–191. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.04.017
4. Mondal NK umar, Das C, Datta JK umar (2015) Effect of mercury on seedling growth, nodulation and ultrastructural deformation of *Vigna radiata* (L) Wilczek. *Environ Monit Assess* 187:241. doi: 10.1007/s10661-015-4484-8
5. Patra M, Sharma A (2000) Mercury toxicity in plants. *Bot Rev* 66:379–422. doi: 10.1007/BF02868923
6. Provencher JF, Mallory ML, Braune BM, et al (2014) Mercury and marine birds in Arctic Canada: effects, current trends, and why we should be paying closer attention. *Environ Rev* 22:244–255. doi: 10.1139/er-2013-0072
7. Li M, Sherman LS, Blum JD, et al (2014) Assessing Sources of Human Methylmercury Exposure Using Stable Mercury Isotopes.
8. Canil D, Crockford PW, Rossin R, Telmer K (2015) Mercury in some arc crustal rocks and mantle peridotites and relevance to the moderately volatile element budget of the Earth. *Chem Geol* 396:134–142. doi: 10.1016/j.chemgeo.2014.12.029
9. Von Burg R (1995) Inorganic Mercury. *J Appl Toxicol* 15:483–493.
10. Zhou J, Wang Z, Sun T, et al (2016) Mercury in terrestrial forested systems with highly elevated mercury deposition in southwestern China: The risk to insects and potential release from wildfires. *Environ Pollut* 212:188–196. doi: 10.1016/j.envpol.2016.01.003
11. Pavlish JH, Sondreal EA, Mann MD, et al (2003) Status review of mercury control options for coal-fired power plants. *Fuel Process Technol* 82:89–165. doi: 10.1016/S0378-3820(03)00059-6
12. Lindberg S, Bullock R, Ebinghaus R, et al (2007) A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition. *Ambio* 36:19–32. doi: 10.1579/0044-7447(2007)36[19:ASOPAU]2.0.CO;2
13. Pacyna EG, Pacyna JM, Sundseth K, et al (2010) Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. *Atmos Environ* 44:2487–2499. doi: 10.1016/j.atmosenv.2009.06.009
14. Lavoie RA, Jardine TD, Chumchal MM, et al (2013) Biomagnification of mercury in aquatic food webs: A worldwide meta-analysis. *Environ Sci Technol* 47:13385–13394. doi: 10.1021/es403103t
15. Mahbub KR, Krishnan K, Naidu R, et al (2017) Mercury toxicity to terrestrial biota. *Ecol Indic* 74:451–462. doi: 10.1016/j.ecolind.2016.12.004
16. Falandysz J, Dryza??owska A, Saba M, et al (2014) Mercury in the fairy-ring of *Gymnopus erythropus* (Pers.) and *Marasmius dryophilus* (Bull.) P. Karst. mushrooms from the Gongga Mountain, Eastern Tibetan Plateau. *Ecotoxicol Environ Saf* 104:18–22. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.02.012
17. Chudzyński K, Bielawski L, Falandysz J (2009) Mercury bio-concentration potential of larch bolete, *suillus grevillei*, mushroom. *Bull Environ Contam Toxicol* 83:275–279. doi: 10.1007/s00128-009-9723-7
18. Jarzyńska G, Falandysz J (2012) Metallic elements profile of Slate Bolete (*Leccinum duriusculum*) mushroom and associated upper soil horizon. *J Geochemical Explor* 121:69–75. doi: 10.1016/j.gexplo.2012.07.001
19. Melgar MJ, Alonso J, García MA (2009) Mercury in edible mushrooms and underlying soil: Bioconcentration factors and toxicological risk. *Sci Total Environ* 407:5328–5334. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.07.001
20. Cocchi L, Vescovi L, Petrini LE, Petrini O (2006) Heavy metals in edible mushrooms in Italy. *Food Chem* 98:277–284. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.068

21. Nasr M, Arp PA (2016) Biomonitoring and assessing total mercury concentrations and pools in forested areas. 47–63. doi: 10.1515/bimo-2015-0008
22. Rieder SR, Brunner I, Horvat M, et al (2011) Accumulation of mercury and methylmercury by mushrooms and earthworms from forest soils. *Environ Pollut* 159:2861–2869. doi: 10.1016/j.envpol.2011.04.040
23. Rieder SR, Frey B (2013) Methyl-mercury affects microbial activity and biomass, bacterial community structure but rarely the fungal community structure. *Soil Biol Biochem* 64:164–173. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.04.017
24. Frey B, Rieder SR (2013) Response of forest soil bacterial communities to mercury chloride application. *Soil Biol Biochem* 65:329–337. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.06.001
25. Rajapaksha RMCP, Bååth E, Ba E (2004) Metal Toxicity Affects Fungal and Bacterial Activities in Soil Differently. *Appl Environ Microbiol* 70:2966–2973. doi: 10.1128/AEM.70.5.2966
26. Cejpková J, Gryndler M, Hršelová H, et al (2016) Bioaccumulation of heavy metals, metalloids, and chlorine in ectomycorrhizae from smelter-polluted area. *Environ Pollut* 218:176–185. doi: 10.1016/j.envpol.2016.08.009
27. Blaudez D, Botton B, Chalot M (2000) Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology* 146:1109–1117. doi: 10.1099/00221287-146-5-1109
28. Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H (2007) Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68:139–146. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.09.023
29. Lenoir I, Fontaine J, Lounès-Hadj Sahraoui A (2016) Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry* 123:4–15. doi: 10.1016/j.phytochem.2016.01.002
30. Khullar S, Reddy MS (2016) Ectomycorrhizal Fungi and Its Role in Metal Homeostasis through Metallothionein and Glutathione Mechanisms. *Curr Biotechnol*. doi: 10.2174/22115501056661605311455
31. Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneines: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53:159–182. doi: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154
32. Bellion M, Courbot M, Jacob C, et al (2006) Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett* 254:173–181. doi: 10.1111/j.1574-6968.2005.00044.x
33. Jacob JM, Sharma S, Balakrishnan RM (2017) Exploring the fungal protein cadre in the biosynthesis of PbSe quantum dots. *J Hazard Mater* 324:54–61. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.12.056
34. Kojo M-R, Lodenius M (1989) Cadmium and mercury in macrofungi - mechanisms of transport and accumulation. *Angew Bot* 63:279–292.
35. Miller SM (2007) Cleaving C-Hg bonds: two thiolates are better than one. *Nat Chem Biol* 3:537–538. doi: 10.1038/nchembio0907-537
36. Wang J, Chen C (2006) Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnol Adv* 24:427–451. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.03.001
37. Adle DJ, Lee J (2008) Expressional control of a cadmium-transporting P1B-type ATPase by a metal sensing degradation signal. *J Biol Chem* 283:31460–31468. doi: 10.1074/jbc.M806054200
38. Fu D, Beeler TJ, Dunn TM (1995) Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca<sup>2+</sup>-sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu<sup>2+</sup>-ATPase subfamily. *Yeast* 11:283–292. doi: 10.1002/yea.320110310
39. Liu GJ, Martin DK, Gardner RC, Ryan PR (2002) Large Mg<sup>2+</sup>-dependent currents are associated with the increased expression of GENEX in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 213:231–237. doi: 10.1016/S0378-1097(02)00822-4
40. Graschopf A, Stadler JA, Hoellerer MK, et al (2001) The Yeast Plasma Membrane Protein GeneX Controls Mg<sup>2+</sup> Homeostasis and is Subject to Mg<sup>2+</sup>-dependent Control of Its Synthesis and Degradation. *J Biol Chem* 276:16216–16222. doi: 10.1074/jbc.M101504200

41. Grognet P, Lalucque H, Silar P (2012) The PaGeneX metal transporter is required for ascospore development in *Podospora anserina*. *Fungal Biol* 116:1111–1118. doi: 10.1016/j.funbio.2012.08.004
42. Da Costa BMT, Cornish K, Keasling JD (2007) Manipulation of intracellular metal levels in *Saccharomyces cerevisiae* with deletion of metal transporters. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:411–425. doi: 10.1007/s00253-007-1177-4
43. Espagne E, Lespinet O, Malagnac F, et al (2008) The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biol* 9:R77. doi: 10.1186/gb-2008-9-5-r77
44. Samczyński Z, Dybczyński RS, Polkowska-Motrenko H, et al (2012) Two new reference materials based on tobacco leaves: certification for over a dozen of toxic and essential elements. *ScientificWorldJournal*. doi: 10.1100/2012/216380
45. Maillard F, Girardclos O, Assad M, et al (2016) Dendrochemical assessment of mercury releases from a pond and dredged-sediment landfill impacted by a chlor-alkali plant. *Environ Res* 148:122–126. doi: 10.1016/j.envres.2016.03.034
46. Giavalisco P, Eckhard N, Lehrach H, et al (2003) Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis. *Electrophoresis* 24:207–216.
47. Team RC (2014) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014.
48. Kungolos a, Aoyama I, Muramoto S (1999) Toxicity of organic and inorganic mercury to *Saccharomyces cerevisiae*. *Ecotoxicol Environ Saf* 43:149–155. doi: 10.1006/eesa.1999.1767
49. Madrid Y, Cabrera C, Perez-Corona T, Camara C (1995) Speciation of Methylmercury and Hg(II) Using Baker's Yeast Biomass (*Saccharomyces cerevisiae*). Determination by Continuous Flow Mercury Cold Vapor Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Anal Chem* 67:750–754. doi: 10.1021/ac00100a010
50. Lim PH, Pisat NP, Gadhia N, et al (2011) Regulation of geneX mg transporter activity by intracellular metal. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0020896
51. van Pel DM, Stirling PC, Minaker SW, et al (2013) *Saccharomyces cerevisiae* Genetics Predicts Candidate Therapeutic Genetic Interactions at the Mammalian Replication Fork. *G3&#58; Genes|Genomes|Genetics* 3:273–282. doi: 10.1534/g3.112.004754
52. MacDiarmid CW, Gardner RC (1998) Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* metal transport system confers resistance to aluminum ion. *J Biol Chem* 273:1727–1732. doi: 10.1074/jbc.273.3.1727
53. Gadd GM (1990) Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia* 46:834–840. doi: 10.1007/BF01935534
54. Rome L, Gadd GM (1987) Measurement of copper uptake in *Saccharomyces cerevisiae* using a Cu<sup>2+</sup>-selective electrode. *FEMS Microbiol Lett* 43:283–287. doi: 10.1111/j.1574-6968.1987.tb02159.x
55. White C, Gadd GM (1986) Uptake and cellular distribution of copper, cobalt and cadmium in strains of *Saccharomyces cerevisiae* cultured on elevated concentrations of these metals. *FEMS Microbiol Lett* 38:277–283. doi: 10.1111/j.1574-6968.1986.tb01738.x
56. Roesijadi G (1982) Uptake and incorporation of mercury into mercury-binding proteins of gills of *Mytilus edulis* as a function of time. *Mar Biol* 66:151–157. doi: 10.1007/BF00397188
57. Bleackley MR, Hayes BM, Parisi K, et al (2014) Bovine pancreatic trypsin inhibitor is a new antifungal peptide that inhibits cellular metal uptake. *Mol Microbiol* 92:1188–1197. doi: 10.1111/mmi.12621
58. Sácák J, Leonhardt T, Borovička J, et al (2014) Intracellular sequestration of zinc, cadmium and silver in *Hebeloma mesophaeum* and characterization of its metallothionein genes. *Fungal Genet Biol* 67:3–14. doi: 10.1016/j.fgb.2014.03.003
59. Courbot M, Diez L, Ruotolo R, et al (2004) Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Appl Environ Microbiol* 70:7413–7417. doi: 10.1128/AEM.70.12.7413-7417.2004
60. Kodre A, Arcon I, Debeljak M, et al (2017) Arbuscular mycorrhizal fungi alter Hg root uptake and ligand environment as studied by X-ray absorption fine structure. *Environ Exp Bot* 133:12–23. doi: 10.1016/j.envexpbot.2016.09.006



#### 4.4.2 Bilan et mise en perspective des travaux

En premier lieu, cette publication décrit l'amélioration de la tolérance au Hg de la souche sauvage reliée à l'augmentation de la concentration dans le milieu de  $Mg^{2+}$  plutôt que d'autres cations. Ceci est relié soit i) à une amélioration de la valeur nutritive du milieu, ii) à une diminution de la biodisponibilité du Hg pour la cellule, iii) la synergie des deux phénomènes précédents. Cependant, la tolérance du mutant pour le transporteur de Ion GeneX/2 n'est pas augmentée par rapport au sauvage. Pour autant, nous constatons que la souche mutante *PaGeneX* est plus tolérante au Hg que pour la souche sauvage ou recombinante. Ceci tant à confirmer que le transport de Ion via la membrane plasmique est relié à la disponibilité du Hg pour les champignons. En réalité, la souche mutante *ScGeneX/2<sup>d</sup>* a une croissance moins performante que le sauvage du fait de la délétion de son transporteur. Pour palier à ce problème, il faudrait étudier un mutant de surexpression du gène *GeneX/2* en émettant l'hypothèse que la croissance sera identique entre ce mutant et le sauvage, et que le mutant de surexpression devrait être plus sensible au Hg que le sauvage. Cette méthode a déjà été utilisée (MacDiarmid & Gardner, 1998), mais nous ne disposons pas des souches mutantes de surexpressions pour l'instant. Nous envisageons d'utiliser le vecteur pYES2 pour sur-exprimer le gène dans la souche sauvage. Cependant, une étude de surexpression systématique de gènes dans un échantillon de plus de 5000 souches de levures montre qu'approximativement 15% des gènes surexprimés impliquent une diminution de la croissance (Sopko *et al.*, 2006). Le gène *GeneX* de la souche *S. cerevisiae* S288C ferait partie de ces 15 % de gènes dont l'inactivation induit une diminution de la croissance selon SGD<sup>20</sup>.

Ensuite, nos travaux montrent une accumulation du Hg significativement réduite par la délétion du gène *ScGeneX/2* chez *S. cerevisiae* tandis que la délétion d'autres gènes n'a pas d'impact significatif sur l'accumulation du Hg. Cette réduction d'accumulation de Hg est confirmée chez *P. anserina* avec le gène *PaGeneX* lorsque ce dernier est délété. De plus, des inhibiteurs de transport transmembranaire impliquent également cette diminution chez *P. anserina*. Les expériences montrent également l'entrée du Hg dans les compartiments cytoplasmique et vacuolaire de *P. anserina* en fonction du temps et la fixation du Hg aux thiols dans le mycélium de *P. anserina*. Par ailleurs, pour *S. cerevisiae* nous constatons également une diminution de l'accumulation du Hg en présence de forte concentration de Ion dans le milieu aussi bien pour la souche sauvage que la souche mutante *ScGeneX/2*. Remarquons cependant que la délétion ne réduit pas entièrement l'accumulation de Hg, ainsi d'autres

<sup>20</sup> <https://www.yeastgenome.org/locus/S000005490/phenotype>

transports pourraient être impliqués. Il est aussi possible qu'une partie du Hg détecté dans les cellules fongiques soit présent sous une forme qui ne rentrerait pas par ce type de transporteurs. De plus, les concentrations en Ion jouent également sur l'accumulation du Hg dans la souche mutante *ScGeneX/2<sup>Δ</sup>* ce qui signifie que le Ion diminue l'accumulation du Hg non seulement par une compétition des ions  $\text{Ion}^{2+}$  et  $\text{Hg}^{2+}$  pour les transporteurs membranaires *GeneX/2*, mais est aussi impliqué dans d'autres phénomènes d'accumulation du Hg.

L'ensemble de ces résultats désignent le transporteur de membrane plasmique *GeneX/2* comme responsable, au moins partiellement, de l'accumulation de Hg dans la cellule fongique. Cependant, pour obtenir des preuves plus directes nous pourrions envisager diverses approches que je ne développerai pas ici, comme le marquage par sonde fluorescente du Hg ou l'étude par modélisation informatique du transport à l'aide de la cristallographie. En revanche, nous avons choisi d'utiliser la transcriptomique pour approfondir notre étude et l'analyse des données est en cours. La partie qui suit propose de décrire brièvement la transcriptomique et le cas de notre expérience.

#### 4.4.3 La transcriptomique : application pour notre étude

La transcriptomique est l'étude du transcriptome qui, par définition, correspond à l'ensemble des molécules d'ARN issues d'une source donnée en incluant les ARNs messagers (environ 2% du total), les ARN ribosomiques, les ARNs de transfert et les divers ARNs non codants (Krawetz & Womble, 2003). La source du transcriptome peut être une cellule, une colonie de cellules (Mattenberger *et al.*, 2017) ou encore un tissu (Beauclercq *et al.*, 2017), un organe (Hitzemann *et al.*, 2014) ou un organisme (Standage *et al.*, 2016). Contrairement au génome d'une cellule, le transcriptome peut varier en fonction des conditions environnementales. En effet, en excluant les phénomènes de mutations, le génome d'une cellule est relativement fixe tandis que de rapides variations peuvent être observées dans le transcriptome.

L'hypothèse faite propose qu'un changement de la production en ARNm soit corrélé avec l'expression d'un phénotype différent *via* un changement de la production de protéines. Pour notre étude, nous voulons déterminer les effets de l'exposition au Hg sur *ScWT* et *ScGeneX<sup>Δ</sup>* en testant les modalités suivantes :

- *ScWT* en condition contrôle
- *ScWT* soumis à 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$
- *ScGeneX<sup>Δ</sup>* en condition contrôle
- *ScGeneX<sup>Δ</sup>* soumis à 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$

Contrairement au « métabarcoding » ou au « shotgun metagenomic sequencing » où c'est l'ADN qui doit être extrait, cette approche implique l'extraction des ARNs. La méthode donne l'opportunité d'observer les changements au sein du transcriptome de plusieurs populations de cellules en fonction de conditions environnementales préétablies. Ensuite, l'ARN environnemental peut être séquencé à l'instar de l'ADN à l'aide du séquençage à très haut débit. Ainsi, les dizaines de millions de séquences ARN générées permettent une caractérisation de l'expression génique en cours au moment de l'extraction de l'ARN. L'objectif est alors de découvrir des structures dans les données (des patrons) qui peuvent expliquer le problème biologique étudié et de répondre à diverses questions :

- ✓ Quels gènes ont un comportement identique parmi tout un ensemble d'expériences?
- ✓ Quelles conditions expérimentales perturbent de manières identiques les gènes d'intérêt?
- ✓ Quels sont les gènes les plus sur/sous exprimés dans une condition donnée ?

Pour illustrer, voici un exemple de ce qu'il est possible d'obtenir à l'aide de la transcriptomique chez *S. cerevisiae* (Pang *et al.*, 2017) :

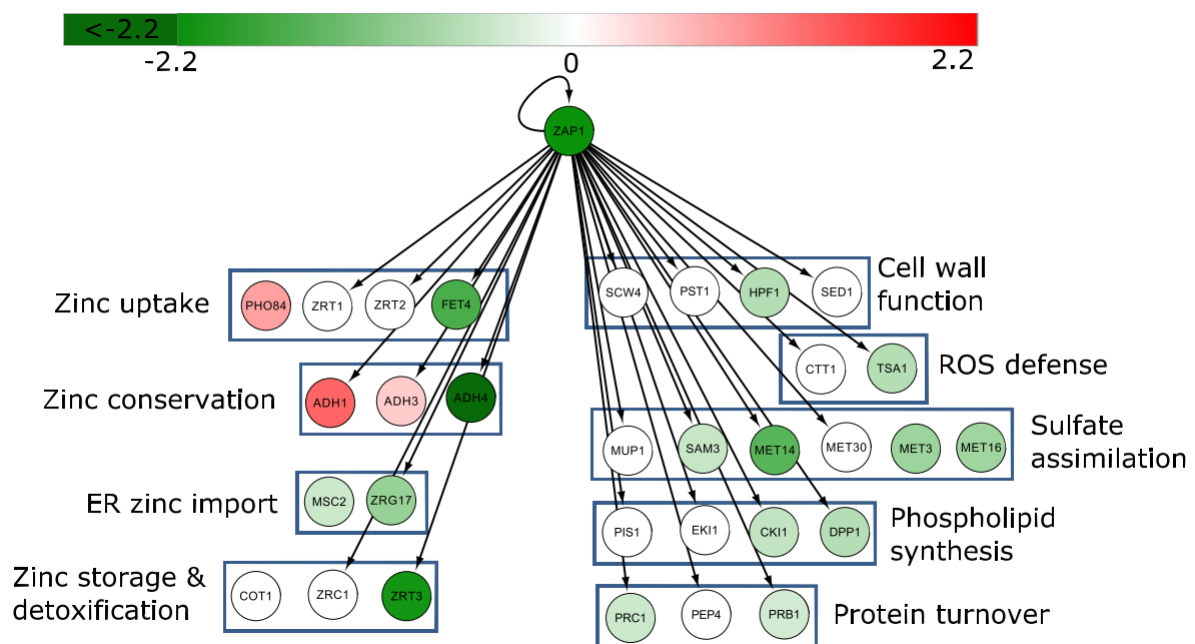
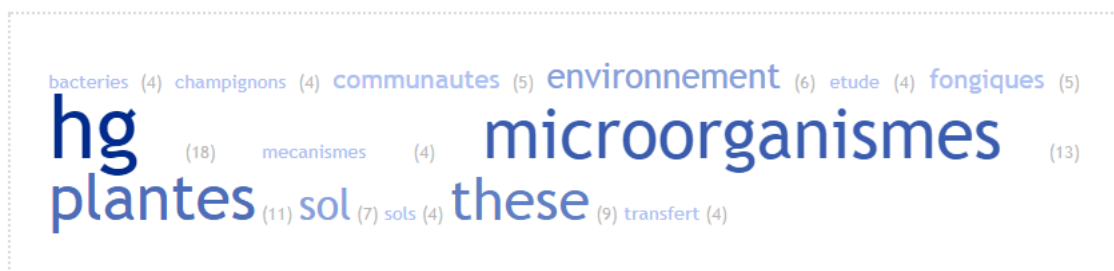


Figure 70 : Le réseau de régulation transcriptionnelle du facteur de transcription Zap1p ainsi que l'expression de ses gènes cibles indiquent une dérégulation de l'homéostasie des métaux lors d'un traitement antifongique (synergie de l'amphotéricine B et de la lactoferrine). La base de données Yeastract a été utilisée pour identifier les gènes cibles du facteur de transcription Zap1p dans ces conditions. La figure présente l'expression différentielle de Zap1p et de ses gènes cibles sous traitement antifongique, 16 des 32 gènes cibles sont sous exprimés (en vert). Dans le réseau, chaque cercle représente un gène avec son identifiant. La barre indique le changement d'expression (log2) dans le réseau, sous expression en vert, surexpression en rouge et pas de différence significative en blanc. Les cadres bleus indiquent des interactions protéines-protéines. Les flèches noires montrent les régulations transcriptionnelles, avec la flèche pointant sur le gène cible.



## Chapitre 4 : conclusions

---



*Analyse sémantique du chapitre 4 : conclusions*



## **4.5 Conclusion générale**

Cette thèse doit avant toute chose être située dans le contexte de dégradation des sols en France, en Europe et dans le Monde où la population s'accroît toujours plus vite. Les pressions foncières, industrielles, agricoles et la multiplication et réseaux de transports sont à l'origine de la diminution de la qualité du sol de notre planète. Il est bon de rappeler que le sol est le support, au sens le plus littéral du terme, de toute activité humaine. C'est dans ce cadre que des études sur les environnements contaminés, le sujet de cette thèse, sont indispensables pour comprendre, anticiper et aménager le territoire dans le futur. Il s'agit non seulement d'apporter des connaissances fondamentales sur les mécanismes liés aux contaminants dans leur environnement, mais aussi par une approche très pragmatique, de solutionner des problèmes concrets. Le phytomanagement est une approche innovante et intégrative pour la gestion des sites et sols pollués qui considère le sol contaminé non seulement comme un site à réhabiliter à l'aide de plantes et de microorganismes, mais aussi comme une ressource à exploiter, rendant des services écosystémiques que des procédés classiques ne pourraient fournir. Alors que le temps de croissance des plantes reste un frein pour l'application des procédés de phytoremédiation, puisque les sites traités ne sont plus exploitables par le propriétaire pour un temps long, le phytomanagement apporte une viabilité économique qui tend à lever ces freins.

Dans l'environnement terrestre, les plantes constituent un support qui fournit des habitats variés à de nombreuses communautés de microorganismes, aussi bien bactériens que fongiques, aussi bien en sous-sols au niveau de la rhizosphère où de nombreux échanges avec les sols ont lieu, que dans la phyllosphère où les échanges se font avec l'atmosphère. Les microorganismes peuvent être considérés comme des interfaces pouvant inhiber, améliorer ou encore modifier les échanges entre les plantes et leur environnement. Ce constat attire évidemment l'attention des chercheurs qui explorent et cherchent à maîtriser les phénomènes reliant plantes et microorganismes. La conception d'inocula bactériens et fongiques permettrait alors d'augmenter la croissance, la santé, la résistance ou encore l'accumulation de polluants par les plantes. Pour autant, le monde des microorganismes reste relativement inaccessible puisque, par définition, évoluant à des ordres de grandeur microscopique. De plus, les connaissances rassemblées jusqu'alors témoignent d'une complexité déroutante du fait de la diversité des microorganismes et de leurs interactions avec leur micro-environnement. Dans cette thèse, l'exploration du microbiome dans un contexte naturel, participe à la compréhension des communautés de microorganismes associées aux plantes et dans le domaine du phytomanagement, vise à optimiser les interactions bénéfiques pour la plante.

Parmi les ETMs le Hg est l'un des plus toxiques. A faible concentration, il a déjà des effets néfastes sur les êtres vivants. Du fait de sa capacité à se bioamplifier rapidement tout au long de la chaîne alimentaire, il peut se retrouver très concentré dans la chair des poissons et l'Homme y est exposé via leur consommation, pouvant engendrer la dégradation du système nerveux et la mort. Cependant, le cycle du Hg n'est que partiellement connu. En effet, le manque de connaissance sur les processus de transferts, d'accumulations et de transformations du Hg dans l'environnement est un frein pour la compréhension de son cycle dans l'environnement et pour la maîtrise des risques qui y sont liés. Pour ce qui est des microorganismes, la littérature scientifique révèle que les communautés de bactéries sont plus sensibles que les communautés de champignons mais que certaines possèdent des mécanismes de résistance et de transformation qui commencent à être bien connues, tandis que parmi les champignons, certains sont capables d'accumuler des taux très importants de Hg dans leurs tissus. Malgré tous ces constats, peu de mécanismes ont été révélés. Ainsi, lors de cette thèse une étude du transfert du Hg vers les tissus des plantes et des microorganismes a été menée alors que peu de connaissances dans le domaine font consensus.

Très concrètement, cette thèse se déroule dans le cadre du dispositif BIOFILTREE (ANR 2010-2014) et du projet Freidi-Hg (CNRS-EC2CO 2015-2016) où sont combinées la production de biomasse (bois de chauffage) sur une friche industrielle et l'étude du cycle du Hg vis-à-vis du couvert végétal et des microorganismes associés à la rhizosphère et à la phyllosphère. A l'aide des technologies de séquençages haut débit, de méthodes de microbiologie et de cultures de plantes en conditions contrôlées, ma thèse s'intéresse aux communautés de microorganismes associées aux plantes dans un contexte de contamination du sol par le Hg et au transfert du Hg dans les microorganismes et les plantes. Mes travaux ont révélé une communauté de champignons particulièrement abondante dans la phyllosphère tandis que la diversité bactérienne est plus faible dans ces habitats. Par l'intermédiaire de réseaux de co-occurrences, mon travail montre que certaines OTUs fongiques rares ont de l'importance au sein de leur communauté. De fait, l'abondance d'une OTU bien que fondamentale dans le rôle que celle-ci peut avoir, ne devrait pas être l'unique critère pour décrire une communauté de microorganismes. Ma thèse montre également que dans un sol enrichi en Hg par une activité industrielle passée, la concentration de Hg est corrélée négativement avec la richesse et la diversité des champignons de ce sol. De plus, le genre fongique *Trichoderma*, ou encore les classes fongiques *Eurotiomycetes* et *Sordariomycetes* se révèlent plus abondantes dans les sols riches en Hg. Mes travaux ont également permis d'évaluer les effets du Hg sur la cultivabilité des bactéries pour sept habitats distincts montrant



que les bactéries cultivables du sol sont plus résistantes au Hg que celles des parties aériennes et que les épiphytes sont plus résistantes que les endophytes. Parmi les résultats inattendus, notons la présence de PGPB isolées depuis l'épispère des tiges et des feuilles (*Pseudomonas graminis*) résistantes au Hg et qui posséderaient des capacités de fixation d'N atmosphériques. En outre, ma thèse a permis la confrontation des données issues du séquençage et des méthodes plus traditionnelles d'isolement de bactéries, établissant la complémentarité des deux approches pour appréhender le microbiome. Par ailleurs, l'étude du transfert du Hg dans la biosphère a montré que le poivron (*Capcicum annum*) est un bioindicateur efficace du Hg atmosphérique dans des conditions contrôlées et sur site industriel. Enfin, les travaux de recherches sur le transfert du Hg dans les cellules fongiques de *S. cerevisiae* et *P. anserina* montrent le rôle putatif du transporteur GeneX/2, transporteur de  $\text{Ion}^{2+}$  de la membrane plasmique, qui serait impliqué dans le transport de Hg chez les cellules fongiques.

L'ensemble des résultats réunis dans cette thèse, à l'aide de méthodes et d'outils très variés, confirme la complexité du microbiome et le rôle fondamental que les microorganismes jouent dans l'environnement. Leur étude est une formidable occasion d'accéder à une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent les cycles biogéochimiques des écosystèmes de notre planète.



# Références bibliographiques:

---

- Abanda-Nkpwatt D, Müsch M, Tschiersch J, Boettner M, Schwab W. 2006.** Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: Growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *Journal of Experimental Botany* **57**: 4025–4032.
- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME, Jr. 1992.** *Ethylene in Plant Biology (Livre numérique Google)*.
- Adams P, De-Leij FAAM, Lynch JM. 2007.** *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microbial Ecology* **54**: 306–313.
- Ahakoud M. 2015.** Le séquençage d'acide désoxyribonucléique: principe technique, indications médicales et expérience du CHU Hassane II de Fés. *thèse*.
- Ahemad M, Kibret M. 2014.** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science* **26**: 1–20.
- Ahmed E, Holmström SJM. 2014.** Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial biotechnology*.
- Alexander EB. 1988.** Rates of soil formation: Implications for soil-loss tolerance. *Soil Science* **145**: 37–45.
- Alexander DB, Zuberer D a. 1991.** Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* **12**: 39–45.
- Almario J, Bruto M, Vacheron J, Prigent-Combaret C, Moëgne-Loccoz Y, Muller D. 2017.** Distribution of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes among the *Pseudomonas* spp. reveals unexpected polyphyly. *Frontiers in Microbiology* **8**: 1–9.
- Andersson-Sköld Y, Bardos P, Chalot M, Bert V, Crutu G, Phanthavongsa P, Delplanque M, Track T, Cundy AB. 2014.** Developing and validating a practical decision support tool (DST) for biomass selection on marginal land. *Journal of Environmental Management* **145**: 113–121.
- Arshad M, Silvestre J, Pinelli E, Kallerhoff J, Kaemmerer M, Tarigo A. 2005.** A field study of lead phytoextraction by various scented *Pelargonium* cultivars. *Chemosphere*, *71*(11), 2187-2192.
- Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha J oao BT. 2006.** Metallothioneins: mercury species-specific induction and their potential role in attenuating neurotoxicity. *Experimental Biology and Medicine*, *231*(9), 1468-1473.
- Ashraf MA, Hussain I, Rasheed R, Iqbal M, Riaz M, Arif MS. 2017.** Advances in microbe-assisted reclamation of heavy metal contaminated soils over the last decade: A review. *Journal of Environmental Management* **198**: 132–143.
- Assad M. 2017.** Transfert des éléments traces métalliques vers les végétaux : mécanismes et évaluation des risques dans des environnements exposés à des activités anthropiques.
- Assad M, Parelle J, Cazaux D, Gimbert F, Chalot M, Tatin-froux F. 2015.** Mercury uptake into poplar leaves. *Chemosphere* **146**: 1–7.
- Atamna-ismaeel N, Finkel OM, Glaser F, Sharon I, Schneider R, Post AF, Spudich JL, Mering C Von, Vorholt JA, Iluz D. 2013.** Microbial rhodopsins on leaf surfaces of terrestrial plants. *Environ Microbiol.* **14**: 140–146.
- Azcón R, Perálvarez MDC, Roldán A, Barea J-M. 2010.** Arbuscular mycorrhizal fungi, *Bacillus cereus*, and *Candida parapsilosis* from a multicontaminated soil alleviate metal toxicity in plants. *Microbial ecology* **59**: 668–77.
- Babu AG, Shea PJ, Oh BT. 2014.** *Trichoderma* sp. PDR1-7 promotes *Pinus sylvestris* reforestation of lead-contaminated mine tailing sites. *Science of the Total Environment* **476–477**: 561–567.
- Bacci E, Gaggi C, Duccini M, Bargagli R, Renzoni A. 1994.** Mapping mercury vapours in an abandoned cinnabar mining area by azalea (*Azalea indica*) leaf trapping. *Chemosphere* **29**: 641–656.
- Badri D V., Zolla G, Bakker MG, Manter DK, Vivanco JM. 2013.** Potential impact of soil microbiomes on the leaf metabolome and on herbivore feeding behavior. *New Phytologist* **198**: 264–273.
- Baize D. 2009.** Éléments traces dans les sols - Fonds géochimiques, fonds pédogéochimiques naturels et teneurs agricoles habituelles : définitions et utilisés. *Courrier de l'environnement de l'INRA n°57*: 63–72.
- Baize D, Deslais W, Saby N. 2007.** Teneurs en huit éléments en traces (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn) dans les sols agricoles en France. *Résultats d'une collecte de données à l'échelon national. Rapport ADEME*: 86pp.
- Baize D, Tercé M. 2002.** *Les éléments traces métalliques dans les sols : approches fonctionnelles et spatiales*. Institut national de la recherche agronomique.
- Baldani VLD, Döbereiner J. 1980.** Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.* **12**: 433–439.
- Baldrian P. 2017.** Forest microbiome: Diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiology Reviews* **41**: 109–130.
- Baldrian P, Gabriel J. 1997.** Effect of heavy metals on the growth of selected wood-rotting basidiomycetes. *Folia Microbiologica* **42**: 521–523.
- Baldrian P, in der Wiesche C, Gabriel J, Nerud F, Zadrazil F. 2000.** Influence of cadmium and mercury on activities of lignolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2471–2478.
- Balint M, Bartha L, O'Hara RB, Olson MS, Otte J, Pfenninger M, Robertson AL, Tiffin P, Schmitt I. 2015.** Relocation, high-latitude warming and host genetic identity shape the foliar fungal microbiome of poplars. *Molecular Ecology* **24**: 235–248.
- Balint M, Tiffin P, Hallstrom B, O'Hara RB, Olson MS, Fankhauser JD, Piepenbring M, Schmitt I. 2013.** Host Genotype Shapes the Foliar Fungal Microbiome of Balsam Poplar (*Populus balsamifera*). *PLoS ONE* **8**: e53987.
- Bar-Ness E, Chen Y, Hadar Y. 1991.** Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot plants. *Plant and Soil* **130**: 231–241.
- Barberán A, Bates ST, Casamayor EO, Fierer N. 2012.** Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *The ISME Journal* **6**: 343–351.

- Barillot C. 2012.** Étude des potentialités rhizoremédiatrices et de la diversité des bactéries rhizosphériques d'*Arabidopsis halleri*, plante hyperaccumulatrice de Zn et Cd. Thèse de doctorat. Université de Lorraine.
- Barret M, Briand M, Bonneau S, Prvéaux A, Valière S, Bouchez O, Hunault G, Simoneau P, Jacques M-A. 2015.** Emergence Shapes the Structure of the Seed Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology* **81**: 1257–1266.
- Baudoin E, Benizri E, Guckert A. 2003.** Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **35**: 1183–1192.
- Beauclercq S, Hennequet-Antier C, Praud C, Godet E, Collin A, Tesseraud S, Metayer-Coustard S, Bourin M, Moroldo M, Martins F, et al. 2017.** Muscle transcriptome analysis reveals molecular pathways and biomarkers involved in extreme ultimate pH and meat defect occurrence in chicken. *Scientific Reports*, *7*(1), 6447.
- Becerra-Castro C, Kidd PS, Prieto-Fernández Á, Weyens N, Acea MJ, Vangronsveld J. 2011.** Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: Isolation and characterisation. *Plant and Soil* **340**: 413–433.
- Beckers B, Op De Beeck M, Thijs S, Truyens S, Weyens N, Boerjan W, Vangronsveld J. 2016.** Performance of 16s rRNA primer pairs in the study of rhizosphere and endosphere bacterial microbiomes in metabarcoding studies. *Frontiers in Microbiology* **7**.
- Beckers B, Op De Beeck M, Weyens N, Boerjan W, Vangronsveld J. 2017.** Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees. *Microbiome* **5**: 25.
- Belimov a. a., Hontzeas N, Safronova VI, Demchinskaya SV, Piluzza G, Bullitta S, Glick BR. 2005.** Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 241–250.
- Bell TH, Cloutier-Hurteau B, Al-Otaibi F, Turmel MC, Yergeau E, Courchesne F, St-Arnaud M. 2015.** Early rhizosphere microbiome composition is related to the growth and Zn uptake of willows introduced to a former landfill. *Environmental Microbiology* **17**: 3025–3038.
- Bell TH, El-Din Hassan S, Lauron-Moreau A, Al-Otaibi F, Hijri M, Yergeau E, St-Arnaud M. 2014.** Linkage between bacterial and fungal rhizosphere communities in hydrocarbon-contaminated soils is related to plant phylogeny. *The ISME journal* **8**: 331–43.
- Bellion M, Courbot M, Jacob C, Blaudez D, Chalot M. 2006.** Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters* **254**: 173–181.
- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP. 2012.** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology* **35**: 1044–51.
- Benizri E, Piutti S, Rue M, Durand A, Morel J, Echevarria G. 2016.** Enhanced phytoextraction of nickel from contaminated soil by hyperaccumulator plant co-cropping associated. In *13th SGA Meeting "Mineral Resources in a Sustainable World* (p. np).
- Bert V, Allemon J, Sajet P, Dieu S, Papin A, Collet S, Gaucher R, Chalot M, Michiels B, Raventos C. 2017.** Torrefaction and pyrolysis of metal-enriched poplars from phytotechnologies: Effect of temperature and biomass chlorine content on metal distribution in end-products and valorization options. *Biomass and Bioenergy* **96**: 1–11.
- Bert V, Hadji-Sahraoui A, Leyval C, Fontaine J, Ouvrard S. 2013.** *Les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués: état de l'art et guide de mise en oeuvre*.
- Berthelot C. 2017.** Les endophytes bruns septés dans les sols pollués aux éléments traces métalliques (ETM) : Caractérisation, effet sur les plantes et mécanismes de tolérance aux ETM. Thèse de doctorat. Université de Lorraine.
- Berthelot C, Leyval C, Foulon J, Chalot M, Blaudez D. 2016.** Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites. *FEMS Microbiology Ecology* **92**.
- Bleackley MR, Hayes BM, Parisi K, Saiyed T, Traven A, Potter ID, van der Weerden NL, Anderson MA. 2014.** Bovine pancreatic trypsin inhibitor is a new antifungal peptide that inhibits cellular metal uptake. *Molecular Microbiology* **92**: 1188–1197.
- Bodenhausen N, Bortfeld-Miller M, Ackermann M, Vorholt JA. 2014.** A Synthetic Community Approach Reveals Plant Genotypes Affecting the Phyllosphere Microbiota. *PLoS Genetics* **10**.
- Boening DW. 2000.** Ecological effects, transport, and fate of mercury: A general review. *Chemosphere* **40**: 1335–1351.
- Bonito G, Reynolds H, Robeson MS, Nelson J, Hodkinson BP, Tuskan G, Schadt CW, Vilgalys R. 2014.** Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Molecular ecology* **23**: 3356–70.
- Boopathy R. 2000.** Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* **74**: 63–67.
- Boro MC, Beriam LOS, Guzzo SD. 2011.** Induced resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in passion fruit plants. **36**: 74–80.
- Brandl MT, Lindow SE. 1998.** Contribution of Indole-3-Acetic Acid Production to the Epiphytic Fitness of *Erwinia herbicola*. Contribution of Indole-3-Acetic Acid Production to the Epiphytic Fitness of *Erwinia herbicola*. **64**.
- Bressan M, Mougél C, Dequiedt S, Maron P-A, Lemanceau P, Ranjard L. 2008.** Response of soil bacterial community structure to successive perturbations of different types and intensities. *Environmental microbiology* **10**: 2184–2187.
- Briat J, Vert G. 2004.** Acquisition et gestion du fer par les plantes. *Cahiers Agricultures* **13**: 183–201.
- Bridges CC, Zalups RK. 2010.** Transport of inorganic mercury and methylmercury in target tissues and organs. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews* **13**: 385–410.
- Bringel F, Couée I. 2015.** Pivotal roles of phyllosphere microorganisms at the interface between plant functioning and atmospheric trace gas dynamics. *Frontiers in Microbiology* **6**: 1–14.
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. 2000.** Microbial Resistance to Metals in the Environment. **207**: 198–207.
- Brundrett M. 2004.** Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* **79**: 473–495.
- Buée M, Reich M, Murat C, Morin E, Nilsson RH, Uroz S, Martin F. 2009.** 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist* **184**: 449–456.
- Von Burg R. 1995.** Inorganic Mercury. *Journal Of Applied Toxicology* **15**: 483–493.

- Cabello-Conejo MI, Becerra-Castro C, Prieto-Fernández a., Monterroso C, Saavedra-Ferro a., Mench M, Kidd PS. 2014.** Rhizobacterial inoculants can improve nickel phytoextraction by the hyperaccumulator *Alyssum pintodasilvae*. *Plant and soil*, 379(1-2), 35-50.
- Cabral L, Soares CRFS, Giachini AJ, Siqueira JO. 2015.** Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31: 1655–1664.
- De Cáceres M, Legendre P, Wisser SK, Brotons L. 2012.** Using species combinations in indicator value analyses. *Methods in Ecology and Evolution* 3: 973–982.
- Calvet R, Barriuso E, Bedos C. 2005.** *Les pesticides dans le sol : conséquences agronomiques et environnementales*. France Agricole.
- Calvo P, Nelson L, Kloepper JW. 2014.** Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil* 383: 3–41.
- Campbell L, Verburg P, Dixon DG, Hecky RE. 2008.** Mercury biomagnification in the food web of Lake Tanganyika (Tanzania, East Africa). *Science of the Total Environment* 402: 184–191.
- Canil D, Crockford PW, Rossin R, Telmer K. 2015.** Mercury in some arc crustal rocks and mantle peridotites and relevance to the moderately volatile element budget of the Earth. *Chemical Geology* 396: 134–142.
- Cardinale M, Grube M, Erlacher A, Quehenberger J, Berg G. 2015.** Bacterial networks and co-occurrence relationships in the lettuce root microbiota. *Environmental Microbiology* 17: 239–252.
- Carini P, Marsden PJ, Leff JW, Morgan EE, Strickland MS, Fierer N. 2016.** Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nature microbiology*, 2(3), 16242.
- Castignetti D, Smarrelli J. 1986.** Siderophores, the iron nutrition of plants, and nitrate reductase. *FEBS Letters* 209: 147–151.
- Chalot M, Blaudez D, Rogaume Y, Provent AS, Pascual C. 2012.** Fate of trace elements during the combustion of phytoremediation wood. *Environmental Science and Technology* 46: 13361–13369.
- Chalot M, Brun A, Botton B, S??derstr??m B. 1996.** Kinetics, energetics and specificity of a general amino acid transporter from the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology* 142: 1749–1756.
- Chang P, Gerhardt KE, Huang X-D, Yu X-M, Glick BR, Gerwing PD, Greenberg BM. 2014.** Plant Growth-Promoting Bacteria facilitate the growth of barley and oats in salt-impacted soil: implications for phytoremediation of saline soils. *International Journal of Phytoremediation* 16: 1133–1147.
- Chao Y, Liu W, Chen Y, Chen W, Zhao L, Ding Q, Wang S, TANG Y-T, Zhang T, Qiu R-L. 2016.** Structure, Variation, and Co-occurrence of Soil Microbial Communities in Abandoned Sites of a Rare Earth Elements Mine. *Environmental Science & Technology*: acs.est.6b02284.
- Chen L, Dodd IC, Theobald JC, Belimov A a, Davies WJ. 2013.** The rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2, containing ACC deaminase, promotes growth and development of *Arabidopsis thaliana* via an ethylene-dependent pathway. *Journal of experimental botany* 64: 1565–73.
- Chen L, Luo S, Xiao X, Guo H, Chen J, Wan Y, Li B, Xu T, Xi Q, Rao C, et al. 2010.** Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils. *Applied Soil Ecology* 46: 383–389.
- Chen J, Yang ZM. 2012.** Mercury toxicity, molecular response and tolerance in higher plants. *BioMetals* 25: 847–857.
- Choudhary DK, Johri BN. 2009.** Interactions of *Bacillus* spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research* 164: 493–513.
- Christmas R, Avila-Campillo I, Bolouri H, Schwikowski B, Anderson M, Kelley R, Landys N, Workman C, Ideker T, Cerami E, et al. 2005.** Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *American Association for Cancer Research Education Book* 13: 2498–2504.
- Chudzyński K, Bielawski L, Falandysz J. 2009.** Mercury bio-concentration potential of larch bolete, *suillus grevillei*, mushroom. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83: 275–279.
- Ciadamidaro L, Girardclos O, Bert V, Zappellini C, Yung L, Foulon J, Papin A, Roy S, Blaudez D, Chalot M. 2017.** Poplar biomass production at phytomanagement sites is significantly enhanced by mycorrhizal inoculation. *Environmental and Experimental Botany* 139: 48–56.
- Clarkson TW, Magos L. 2006.** The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 609–662.
- Cobbett C, Goldsbrough P. 2002.** Phytochelatins and metallothioneines: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159–182.
- Cocchi L, Vescovi L, Petrini LE, Petrini O. 2006.** Heavy metals in edible mushrooms in Italy. *Food Chemistry* 98: 277–284.
- Coince A, Cordier T, Lengellé J, Defossez E, Vacher C, Robin C, Buée M, Marçais B. 2014.** Leaf and root-associated fungal assemblages do not follow similar elevational diversity patterns. *PloS one* 9: e100668.
- Coleman-Derr D, Desgarenes D, Fonseca-Garcia C, Gross S, Clingenpeel S, Woyke T, North G, Visel A, Partida-Martinez LP, Tringe S. 2015.** Biogeography and cultivation affect microbiome composition in the drought-adapted plant Subgenus *Agave*. *New Phytologist* 209: 798–811.
- Colinon C, Deredjian a, Hien E, Brothier E, Bouziri L, Cournoyer B, Hartman a, Henry S, Jolivet C, Ranjard L, et al. 2013.** Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in soil and manure assessed by an ecfX qPCR assay. *Journal of applied microbiology* 114: 1734–49.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A. 2009.** Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 669–678.
- Conrath U, Beckers GJM, Langenbach CJG, Jaskiewicz MR. 2015.** Priming for enhanced defense. *Annual review of phytopathology* 53: 97–119.
- Copeland JK, Yuan L, Layeghifard M, Wang PW, Guttman DS. 2015.** Seasonal Community Succession of the Phyllosphere Microbiome. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28: 274–285.

- Cordier T, Robin C, Capdevielle X, Fabreguettes O, Desprez-Loustau M-L, Vacher C. 2012.** The composition of phyllosphere fungal assemblages of European beech (*Fagus sylvatica*) varies significantly along an elevation gradient. *New Phytologist*, 196(2), 510-519.
- Da Costa BMT, Cornish K, Keasling JD. 2007.** Manipulation of intracellular metal levels in *Saccharomyces cerevisiae* with deletion of metal transporters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77: 411-425.
- Couradeau E, Karaoz U, Lim HC, Nunes da Rocha U, Northen T, Brodie E, Garcia-Pichel F. 2016.** Bacteria increase arid-land soil surface temperature through the production of sunscreens. *Nat Commun* 7: 10373.
- Crane S, Barkay T, Dighton J. 2012.** The effect of mercury on the establishment of *Pinus rigida* seedlings and the development of their ectomycorrhizal communities. *Fungal Ecology* 5: 245-251.
- Dabrowska G, Hryniewicz K, Trejgell A, Baum C. 2016.** The effect of plant-growth-promoting rhizobacteria on the phytoextraction of Cd and Zn by *Brassica napus* L. *Int J Phytoremediation* 19: 0.
- Dakora FD, Phillips DA. 2002.** Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. In *Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities* (pp. 201-213).
- Dametto P. 2011.** Sequencing technologies – the next generation.
- Danielsen L, Thürmer A, Meinicke P, Buée M, Morin E, Martin F, Pilate G, Daniel R, Polle A, Reich M. 2012.** Fungal soil communities in a young transgenic poplar plantation form a rich reservoir for fungal root communities. *Ecology and Evolution* 2: 1935-1948.
- Das S, Chou ML, Jean JS, Yang HJ, Kim PJ. 2017.** Arsenic-enrichment enhanced root exudates and altered rhizosphere microbial communities and activities in hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Journal of Hazardous Materials* 325: 279-287.
- Dash HR, Das S. 2012.** Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 75: 207-213.
- Dawson TP, Jackson ST, House JI, Prentice IC, Mace GM. 2011.** Beyond Predictions: Biodiversity Conservation in a Changing Climate. *Science* 332.
- Defez R, Andreozzi A, Bianco C. 2017.** The Overproduction of Indole-3-Acetic Acid (IAA) in Endophytes Upregulates Nitrogen Fixation in Both Bacterial Cultures and Inoculated Rice Plants. *Microbial Ecology*: 1-12.
- Delmotte N, Knief C, Chaffron S, Innerebner G, Roschitzki B, Schlapbach R, von Mering C, Vorholt JA. 2009.** Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *PNAS* 106: 16428-16433.
- Demirbas A. 2001.** Heavy metal bioaccumulation by mushrooms from artificially fortified soils. *Food Chemistry*, 2001, vol. 74, no 3, p. 293-301.
- Dennis PG, Miller AJ, Hirsch PR. 2010.** Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS microbiology ecology* 72: 313-27.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL. 2006.** Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5069-5072.
- Dimkpa CO, Svatos A, Dabrowska P, Schmidt A, Boland W, Kothe E. 2008.** Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. *Chemosphere* 74: 19-25.
- Dolatabadi HK, Goltapeh EM, Moieni A, Jaimand K, Sardrood BP, Varma A. 2011.** Effect of *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* on plant growth and essential oil yield in *Thymus vulgaris* in vitro and in vivo experiments. *Symbiosis* 53: 29-35.
- Dombrowski N, Schlaeppi K, Agler MT, Hacquard S, Kemen E, Garrido-Oter R, Wunder J, Coupland G, Schulze-Lefert P. 2016.** Root microbiota dynamics of perennial *Arabis alpina* are dependent on soil residence time but independent of flowering time. *The ISME Journal*: 1-13.
- Dominati E, Patterson M, Mackay A. 2010.** A framework for classifying and quantifying the natural capital and ecosystem services of soils. *Ecological Economics* 69: 1858-1868.
- Doty SL, Oakley B, Xin G, Kang JW, Singleton G, Khan Z, Vajzovic A, Staley JT. 2009.** Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow. *Symbiosis* 47: 23-33.
- Dridi B, Zemmouri S. 2012.** Fonctions de pédotransfert pour les vertisols de la plaine de la Mitidja (Algérie): Recherche de paramètres les plus pertinents pour la rétention en eau. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment* 16: 193-201.
- Drønen AK, Torsvik V, Goksøyr J, Top EM. 1998.** Effect of mercury addition on plasmid incidence and gene mobilizing capacity in bulk soil. *FEMS microbiology ecology* 27: 381-394.
- Dryzalowska A, Falandysz J. 2014.** Bioconcentration of mercury by mushroom *Xerocomus chrysenteron* from the spatially distinct locations: Levels, possible intake and safety. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107: 97-102.
- Durand A, Maillard F, Foulon J, Gweon HS, Valot B, Chalot M. 2017.** Environmental Metabarcoding Reveals Contrasting Belowground and Aboveground Fungal Communities from Poplar at a Hg Phytomanagement Site. *Microbial ecology*, 74(4), 795-809.
- Durand A, Piutti S, Rue M, Morel JL, Echevarria G, Benizri E. 2015.** Improving nickel phytoextraction by co-cropping hyperaccumulator plants inoculated by plant growth promoting rhizobacteria. *Plant and Soil* 399: 179-192.
- Eckley CS, Tate MT, Lin CJ, Gustin M, Dent S, Eagles-Smith C, Lutz MA, Wickland KP, Wang B, Gray JE, et al. 2016.** Surface-air mercury fluxes across Western North America: A synthesis of spatial trends and controlling variables. *Science of the Total Environment* 568: 651-665.
- Eevers N, Gielen M, Sánchez-López A, Jaspers S, White JC, Vangronsveld J, Weyens N. 2015a.** Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media. *Microbial biotechnology*, 8(4), 707-715.
- Eevers N, Gielen M, Sánchez-López A, Jaspers S, White JC, Vangronsveld J, Weyens N. 2015b.** Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media: Optimizing isolation of endophytes. *Microbial Biotechnology* 8: 707-715.
- El-Morsy EM, El-Dein MMN, El-Didamoney SMM. 2013.** *Mucor racemosus* as a biosorbent of metal ions from polluted water in Northern Delta of Egypt. *Mycosphere* 4: 1118-1131.

- Ericksen JA, Gustin MS, Schorran DE, Johnson DW, Lindberg SE, Coleman JS. 2003. Accumulation of atmospheric mercury in forest foliage. *Atmospheric environment* **37**: 1613–1622.
- Espagne E, Lespinet O, Malagnac F, Silva C Da, Jaillon O, Porcel BM, Couloux A, Aury J-M, Ségurens B, Poulain J, et al. 2008. The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome biology* **9**: R77.
- Espinosa-Urgel M, Salido A, Ramos JL. 2000. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *Journal of Bacteriology* **182**: 2363–2369.
- Etesami H, Alikhani HA, Jadidi M, Aliakbari A. 2009. Effect of Superior IAA Producing Rhizobia on N, P, K Uptake by Wheat Grown under Greenhouse Condition. *World Applied sciences Journal* **6**: 1629–1633.
- Faassen HG van. 1973. Effects of mercury compounds on soil microbes. *Plant and Soil* **38**: 485–487.
- Falandysz J. 2014. Distribution of mercury in Gypsy Cortinarius caperatus mushrooms from several populations: An efficient accumulator species and estimated intake of element. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **110**: 68–72.
- Falandysz J, Bielawski L. 2001. Mercury Content of Wild Edible Mushrooms Collected Near the Town of Augustów. *Polish Journal of Environmental Studies* **10**: 67–71.
- Falandysz J, Borovička J. 2013. Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: Health benefits and risks. *Applied microbiology and biotechnology* **97**: 477–501.
- Falandysz J, Dryza A, Saba M, Wang J, Zhang D. 2014. Mercury in the fairy-ring of *Gymnopus erythropus* (Pers.) and *Marasmius dryophilus* (Bull.) P. Karst. mushrooms from the Gongga Mountain, Eastern Tibetan Plateau. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **104**: 18–22.
- Falandysz J, Gucia M, Frankowska A, Kawano M, Skwarzec B. 2001. Total mercury in wild mushrooms and underlying soil substrate from the city of Umeå and its surroundings, Sweden. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **67**: 763–770.
- Falandysz J, Gucia M, Skwarzec B, Frankowska A, Klawikowska K. 2002. Total mercury in mushrooms and underlying soil substrate from the Borecka Forest, Northeastern Poland. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **42**: 145–154.
- Farina M, Rocha J b T, Aschner M. 2012. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life sciences* **89**: 555–563.
- Faust K, Lima-Mendez G, Lerat JS, Sathirapongsasuti JF, Knight R, Huttenhower C, Lenaerts T, Raes J. 2015. Cross-biome comparison of microbial association networks. *Frontiers in Microbiology* **6**: 1–13.
- Faust K, Raes J. 2012. Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 538–550.
- Figueiredo NLL, Canário J, Duarte A, Serralheiro ML, Carvalho C. 2014. Isolation and characterization of mercury-resistant bacteria from sediments of Tagus Estuary (Portugal): implications for environmental and human health risk assessment. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* **77**: 155–68.
- Figueiredo NL, Canário J, O'Driscoll NJ, Duarte A, Carvalho C. 2016. Aerobic Mercury-resistant bacteria alter Mercury speciation and retention in the Tagus Estuary (Portugal). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **124**: 60–67.
- Firmin S, Labidi S, Fontaine J, Laruelle F, Tisserant B, Nsanganwimana F, Pourrut B, Dalpé Y, Grandmougin A, Douay F, et al. 2015. Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation protects *Miscanthus x giganteus* against trace element toxicity in a highly metal-contaminated site. *Science of the Total Environment* **527–528**: 91–99.
- Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al. 1995. Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus-Influenzae* Rd. *Science* **269**: 496–512.
- Foulon J, Zappellini C, Durand A, Valot B, Blaudez D, Chalot M. 2016a. Impact of poplar-based phytomanagement on soil properties and microbial communities in a metal-contaminated site. *FEMS microbiology ecology*: fiw163.
- Foulon J, Zappellini C, Durand A, Valot B, Girardclos O, Blaudez D, Chalot M. 2016b. Environmental metabarcoding reveals contrasting microbial communities at two poplar phytomanagement sites. *Science of The Total Environment* **571**: 1230–1240.
- Franchi E, Rolli E, Marasco R, Agazzi G, Borin S, Cosmina P, Pedron F, Rosellini I, Barbafieri M, Petruzzelli G. 2016. Phytoremediation of a multi contaminated soil: mercury and arsenic phytoextraction assisted by mobilizing agent and plant growth promoting bacteria. *Journal of soils and sediments*, **17**(5), 1224–1236.
- Francois F, Lombard C, Guigner J-M, Soreau P, Brian-Jaisson F, Martino G, Vandervennet M, Garcia D, Molinier A-L, Pignol D, et al. 2012. Isolation and Characterization of Environmental Bacteria Capable of Extracellular Biosorption of Mercury. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 1097–1106.
- Frey B, Rieder SR. 2013. Response of forest soil bacterial communities to mercury chloride application. *Soil Biology and Biochemistry* **65**: 329–337.
- Frossard A, Hartmann M, Frey B. 2017. Tolerance of the forest soil microbiome to increasing mercury concentrations. *Soil Biology and Biochemistry* **105**: 162–176.
- Fry SC. 1989. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship. *Physiologia Plantarum* **75**: 532–536.
- Fu S-F, Sun P-F, Lu H-Y, Wei J-Y, Xiao H-S, Fang W-T, Cheng B-Y, Chou J-Y. 2016. Plant Growth-Promoting Traits of Yeasts Isolated from the Phyllosphere and Rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. *Fungal Biology* **120**: 433–448.
- Gabriel J, Svec K, Kolišova D, Tlustos P, Szakova J. 2016. Translocation of mercury from substrate to fruit bodies of *Panellus stipticus*, *Psilocybe cubensis*, *Schizophyllum commune* and *Stropharia rugosoannulata* on oat flakes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **125**: 184–189.
- Gadd GM. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research* **111**: 3–49.
- Gal M, Preston GM, Massey RC, Spiers AJ, Rainey PB. 2003. Genes encoding a cellulosic polymer contribute toward the ecological success of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on plant surfaces. *Molecular Ecology* **12**: 3109–3121.
- Gao Y, Miao C, Xia J, Mao L, Wang Y, Zhou P. 2011. Plant diversity reduces the effect of multiple heavy metal pollution on soil enzyme activities and microbial community structure. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* **6**: 213–223.
- Gao Y, Zhou P, Mao L, Zhi Y, Zhang C, Shi W. 2010. Effects of plant species coexistence on soil enzyme activities and soil microbial community structure under Cd and Pb combined pollution. *Journal of Environmental Sciences* **22**: 1040–1048.

- Garbisu C, Alkorta I. 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource technology* **77**: 229–36.
- Gavériaux J. 2012. Les Glomeromycota. *Ac-Lille.Fr* **17**: 1–17.
- Van Geel M, Ceustermans A, Van Hemelrijck W, Lievens B, Honnay O. 2015. Decrease in diversity and changes in community composition of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of apple trees with increasing orchard management intensity across a regional scale. *Molecular Ecology* **24**: 941–952.
- Gentès S, Taupiac J, Colin Y, André JM, Guyoneaud R. 2017. Bacterial periphytic communities related to mercury methylation within aquatic plant roots from a temperate freshwater lake (South-Western France). *Environmental Science and Pollution Research*: 1–11.
- Gerland P, Raftery AE, Ševčíková H, Li N, Gu D, Spoorenberg T, Alkema L, Fosdick BK, Chunn J, Lalic N, et al. 2014. World population stabilization unlikely this century. *Science* **346**.
- Giannaccini G, Betti L, Palego L, Mascia G, Schmid L, Lanza M, Mela A, Fabbrini L, Biondi L, Lucacchini A. 2012. The trace element content of top-soil and wild edible mushroom samples collected in Tuscany, Italy. *Environmental monitoring and assessment* **184**: 7579–7595.
- Giavalisco P, Eckhard N, Lehrach H, Gobom J, Klose J. 2003. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis. *Electrophoresis* **24**: 207–216.
- Gill SS, Gill R, Trivedi DK, Anjum NA, Sharma KK, Ansari MW, Ansari AA, Johri AK, Prasad R, Pereira E, et al. 2016. Piriformospora indica: Potential and Significance in Plant Stress Tolerance. *Frontiers in Microbiology* **7**: 1–20.
- Gilmour CC, Podar M, Bullock AL, Graham AM, Brown SD, Somenahally AC, Johs A, Hurt RA, Bailey KL, Elias DA. 2013. Mercury methylation by novel microorganisms from new environments. *Environmental Science and Technology* **47**: 11810–11820.
- Glick BR. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 109–117.
- Glick BR. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances* **21**: 383–393.
- Glick BR. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS microbiology letters* **251**: 1–7.
- Glick BR. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* **169**: 30–39.
- Glick B, Patten C, Holguin G, Penrose D. 1999. *Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria*. Imperial College Press.
- Glick B, Penrose D, Li J. 1997. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of theoretical biology* **190**: 63–8.
- Gofieau A, Barrell B, Bussey H, Davis R, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel J, Jacq C, Johnston M, et al. 1996. Life with 6000 genes. *Science*.
- Grangeon S, Guédron S, Asta J, Sarret G, Charlet L. 2012. Lichen and soil as indicators of an atmospheric mercury contamination in the vicinity of a chlor-alkali plant (Grenoble, France). *Ecological Indicators* **13**: 178–183.
- Grognet P, Lalucque H, Silar P. 2012. The PaGeneX metal transporter is required for ascospore development in *Podospora anserina*. *Fungal Biology* **116**: 1111–1118.
- Grünig CR, Queloz V, Sieber TN. 2011. Structure of Diversity in Dark Septate Endophytes: From Species to Genes. In *Endophytes of Forest Trees* (pp. 3–30). Springer, Dordrecht.
- Gweon HS, Oliver A, Taylor J, Booth T, Gibbs M, Read DS, Griffiths RI, Schonrogge K. 2015. PIPITS: An automated pipeline for analyses of fungal ITS sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods in Ecology and Evolution* **6**: 973–980.
- Haas D, Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews. Microbiology* **3**: 307–19.
- Hadavifar M, Bahramifar N, Younesi H, Li Q. 2014. Adsorption of mercury ions from synthetic and real wastewater aqueous solution by functionalized multi-walled carbon nanotube with both amino and thiolated groups. *Chemical Engineering Journal* **237**: 217–228.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95–98.
- Hallmann J, Mahaffee WF, Klopper JW. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* **914**: 895–914.
- Handelsman J, Stabb E V. 1996. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The Plant cell* **8**: 1855–1869.
- Harada M. 1995. Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution. *Critical Reviews in Toxicology* **25**: 1–24.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. Trichoderma species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 43–56.
- Harris-Hellal J, Vallaëys T, Garnier-Zarli E, Bousserhine N. 2009. Effects of mercury on soil microbial communities in tropical soils of French Guyana. *Applied Soil Ecology* **41**: 59–68.
- Healey A, Furtado A, Cooper T, Henry RJ. 2014. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant methods* **10**: 21.
- Helgason T, Feng H, Sherlock DJ, Young JPW, Fitter AH. 2014. Arbuscular mycorrhizal communities associated with maples (*Acer* spp.) in a common garden are influenced by season and host plant. *Botany* **326**: 321–326.
- Hitzemann R, Darakjian P, Walter N, Dan Iancu O, Searles R, McWeeney S. 2014. Introduction to sequencing the brain transcriptome. In *International review of neurobiology* (Vol. 116, pp. 1–19). Academic Press.
- Hojdová M, Rohovec J, Chrástný V, Penížek V, Navrátil T. 2015. The Influence of Sample Drying Procedures on Mercury Concentrations Analyzed in Soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **94**: 570–576.
- Holloway JAM, Goldhaber MB, Scow KM, Drenovsky RE. 2009. Spatial and seasonal variations in mercury methylation and microbial community structure in a historic mercury mining area, Yolo County, California. *Chemical Geology* **267**: 85–95.



- Holtze MS, Nielsen P, Ekelund F, Rasmussen LD, Johnsen K. 2006. Mercury affects the distribution of culturable species of *Pseudomonas* in soil. *Applied Soil Ecology* **31**: 228–238.
- Hsu-Kim H, Kucharzyk KH, Zhang T, Deshusses MA. 2013. Mechanisms regulating mercury bioavailability for methylating microorganisms in the aquatic environment: A critical review. *Environmental Science and Technology* **47**: 2441–2456.
- Huang Q, Jia Y, Wan Y, Li H, Jiang R. 2015. Market survey and risk assessment for trace metals in edible fungi and the substrate role in accumulation of heavy metals. *Journal of Food Science* **80**: H1612–H1618.
- Hussein K a, Joo JH. 2014. Potential of Siderophore Production by Bacteria Isolated from Heavy Metal: Polluted and Rhizosphere Soils. *Current microbiology*, 68(6), 717-723.
- Hüttermann A, Oriquiriza LJB, Agaba H. 2009. Application of superabsorbent polymers for improving the ecological chemistry of degraded or polluted lands. *Clean - Soil, Air, Water* **37**: 517–526.
- van Hylckama Vlieg JET, Leemhuis H, Jeffrey H, Spelberg L, Janssen DB. 2000. Characterization of the Gene Cluster Involved in Isoprene Metabolism in Characterization of the Gene Cluster Involved in Isoprene Metabolism in *Rhodococcus* sp. Strain AD45. *Journal of Bacteriology* **187**: 1956–1963.
- Ibekwe AM, Kennedy AC. 1999. Fatty acid methyl ester ( FAME ) profiles as a tool to investigate community structure of two agricultural soils. *Plant and Soil*, 206(2), 151-161.
- Iguchi H, Sato I, Sakakibar A M, Yurimoto H, Sakai Y. 2012. Distribution of Methanotrophs in the Phyllosphere. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **76**: 1580–1583.
- Inceoğlu Ö, Salles JF, Van Overbeek L, Van Elsland JD. 2010. Effects of plant genotype and growth stage on the betaproteobacterial communities associated with different potato cultivars in two fields. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 3675–3684.
- Issn P, Issn O, Page W. 2017. Phytoremediation potential of heavy metals by two native pasture plants ( *Eucalyptus grandis* and *Ailanthus altissima* ) assisted with AMF and fibrous minerals in contaminated mining regions. *Pollution*, 3(3), 471-486.
- Janoušková M, Pavlíková D, Vosátka M. 2006. Potential contribution of arbuscular mycorrhiza to cadmium immobilisation in soil. *Chemosphere* **65**: 1959–1965.
- Jarzyńska G, Falandysz J. 2012. Trace elements profile of Slate Bolete (*Leccinum duriusculum*) mushroom and associated upper soil horizon. *Journal of Geochemical Exploration* **121**: 69–75.
- Jean-Philippe SR, Franklin JA, Buckley DS, Hughes K. 2011. The effect of mercury on trees and their mycorrhizal fungi. *Environmental Pollution* **159**: 2733–2739.
- Jumpponen A. 2001. Dark septate endophytes - Are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* **11**: 207–211.
- Jumpponen A, Jones KL. 2010. Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. *New Phytologist* **186**: 496–513.
- Kabata-Pendias A. 2010. Trace Elements in Soils and Plants, Fourth Edition. CRC press.
- Kadivar H, Stapleton a E. 2003. Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity. *Microbial ecology* **45**: 353–61.
- Kaiser K, Wemheuer B, Korolow V, Wemheuer F, Nacke H, Schöning I, Schruppf M, Daniel R. 2016. Driving forces of soil bacterial community structure, diversity, and function in temperate grasslands and forests. *Scientific Reports* **6**: 33696.
- Kalac P, Lubmir S. 2000. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry* **69**: 273–281.
- Kawaguchi K, Yurimoto H, Oku M, Sakai Y. 2011. Yeast methylotrophy and autophagy in a methanol-oscillating environment on growing *Arabidopsis thaliana* leaves. *PLoS ONE* **6**: 1–9.
- Kembel SW, O'Connor TK, Arnold HK, Hubbell SP, Wright SJ, Green JL. 2014. Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 13715–13720.
- Khan AG. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* **18**: 355–64.
- Khan WU, Ahmad SR, Yasin NA, Ali A, Ahmad A, Akram W. 2017. Application of *Bacillus megaterium* MCR-8 improved phytoextraction and stress alleviation of nickel in *Vinca rosea*. *International Journal of Phytoremediation* **19**: 813–824.
- Khullar S, Reddy MS. 2016. Ectomycorrhizal Fungi and Its Role in Metal Homeostasis through Metallothionein and Glutathione Mechanisms. *Current Biotechnology* **5**.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol Biol* **16**.
- Kliot A, Kontsedalov S, Lebedev G, Brumin M, Cathrin PB, Marubayashi JM, Skaljic M, Belausov E, Czosnek H, Ghanim M. 2014. Fluorescence &lt;em>in situ</em> Hybridizations (FISH) for the Localization of Viruses and Endosymbiotic Bacteria in Plant and Insect Tissues. *Journal of Visualized Experiments*: 1–8.
- Klopper J, Lifshitz R, Zablutowicz R. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*.
- Kodre A, Arcon I, Debeljak M, Potisek M, Likar M, Vogel-Mikus K. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi alter Hg root uptake and ligand environment as studied by X-ray absorption fine structure. *Environmental and Experimental Botany* **133**: 12–23.
- Kojo M-R, Lodenius M. 1989. Cadmium and mercury in macrofungi - mechanisms of transport and accumulation. *Angew botanic* **63**: 279–292.
- Kolbas A, Mench M, Herzig R, Nehnevajova E, Bes CM. 2011. Copper Phytoextraction in Tandem with Oilseed Production Using Commercial Cultivars and Mutant Lines of Sunflower. *International Journal of Phytoremediation* **13**: 55–76.
- Kolton M, Sela N, Elad Y, Cytryn E. 2013. Comparative Genomic Analysis Indicates that Niche Adaptation of Terrestrial Flavobacteria Is Strongly Linked to Plant Glycan Metabolism. *PLoS ONE* **8**: 1–11.
- Koorem K, Tulva I, Davison J, Jairus T, Opik M, Vasar M, Zobel M, Moora M. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in forest plant roots are simultaneously shaped by host characteristics and canopy-mediated light availability. *Plant and Soil* **410**: 259–271.
- Krawetz SA, Womble DD. 2003. *Introduction to bioinformatics : a theoretical and practical approach*. Springer Science & Business Media.
- Kucey RMN, H.H. J, Leggett ME. 1989. *Microbially mediated increases in plant-available phosphorus*. In *Advances in agronomy* (Vol. 42, pp. 199-228). Academic Press.

- Kumari K, Abraham TE. 2007.** Biosorption of anionic textile dyes by nonviable biomass of fungi and yeast. *Bioresource Technology* **98**: 1704–1710.
- Kumari S, Varma A, Tuteja N, Choudhary DK. 2016.** Bacterial ACC-deaminase: An Eco-friendly Strategy to Cope Abiotic Stresses for Sustainable Agriculture. *Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture*. Singapore: Springer Singapore, 165–185.
- Kumpiene J, Mench M, Bes CM, Fitts JP. 2011.** Assessment of aided phytostabilization of copper-contaminated soil by X-ray absorption spectroscopy and chemical extractions. *Environmental Pollution* **159**: 1536–1542.
- Kurniati E, Arfarita N, Imai T, Higuchi T, Kanno A, Yamamoto K, Sekine M. 2014.** Potential bioremediation of mercury-contaminated substrate using filamentous fungi isolated from forest soil. *Journal of Environmental Sciences*, **26**: 1223–1231.
- Kuss J, Wasmund N, Nausch G, Labrenz M. 2015.** Mercury Emission by the Baltic Sea: A Consequence of Cyanobacterial Activity, Photochemistry, and Low-Light Mercury Transformation. *Environmental Science and Technology* **49**: 11449–11457.
- Laaksovirta K, Lodenius M. 1979.** Mercury content of fungi in Helsinki. *Ann. Bot. Fennici*: 16: 208–212.
- Laforest-Lapointe I, Messier C, Kembel SW. 2016.** Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure. *Microbiome* **4**: 27.
- Laguette G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N. 2001.** Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*: 981–993.
- Lambais MR, Crowley DE, Cury JC, Rodrigues RR. 2006.** BREVIA Bacterial Diversity in Tree Canopies of the Atlantic Forest Supp data. *Science*: 7–7.
- Lavelle P, Lattaud C, Trigo D, Barois I. 1995.** Mutualism and biodiversity in soils. *Plant and soil* **170**: 23–33.
- Lavoie RA, Jardine TD, Chumchal MM, Kidd KA, Campbell LM. 2013.** Biomagnification of mercury in aquatic food webs: A worldwide meta-analysis. *Environmental Science and Technology* **47**: 13385–13394.
- Lebel J, Mergler D, Lucotte M, Amorim M, Dolbec J, Miranda D, Arantès G, Rheault I, Pichet P. 1996.** Evidence of early nervous system dysfunction in Amazonian populations exposed to low-levels of methylmercury. *Neurotoxicology* **17**: 157–67.
- Leeman M, Pelt J Van, Ouden F Den. 1995.** Induction of systemic resistance against Fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* **85**: 1021–1027.
- Lefort F, Douglas GC. 1999.** An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *ANNALS OF FOREST SCIENCE* **56**: 259–263.
- Lemanceau P, Bakker P a, De Kogel WJ, Alabouvette C, Schippers B. 1993.** Antagonistic Effect of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and Pseudobactin 358 upon Pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Applied and environmental microbiology* **59**: 74–82.
- Lemire J a, Harrison JJ, Turner RJ. 2013.** Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature reviews. Microbiology* **11**: 371–84.
- Lentendu G, Zinger L, Manel S, Coissac E, Choler P, Geremia R a., Melodelima C. 2011.** Assessment of soil fungal diversity in different alpine tundra habitats by means of pyrosequencing. *Fungal Diversity* **49**: 113–123.
- Lescord GL, Kidd KA, Kirk JL, O'Driscoll NJ, Wang X, Muir DCG. 2015.** Factors affecting biotic mercury concentrations and biomagnification through lake food webs in the Canadian high Arctic. *Science of the Total Environment* **509–510**: 195–205.
- Leung HM, Wang ZW, Ye ZH, Yung KL, Peng XL, Cheung KC. 2013.** Interactions between arbuscular mycorrhizae and plants in phytoremediation of metal-contaminated soils: A review. *Pedosphere* **23**: 549–563.
- Leyval C, Turnau K, Haselwandter K. 1997.** Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: Physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* **7**: 139–153.
- Li M, Sherman LS, Blum JD, Grandjean P, Mikkelsen B, Weihe P, Sunderland EM, Shine JP. 2014.** Assessing Sources of Human Methylmercury Exposure Using Stable Mercury Isotopes. *Environmental science & technology*, **48**(15), 8800–8806.
- Limtong S, Koowadjanakul N. 2012.** Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**: 3323–3335.
- Lindberg S, Bullock R, Ebinghaus R, Engstrom D, Feng X, Fitzgerald W, Pirrone N, Prestbo E, Seigneur C. 2007.** A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition. *Ambio* **36**: 19–32.
- Lindow SE, Brandl MT. 2003.** MINIREVIEW Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental microbiology* **69**.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. 2012.** Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012**.
- Loon L Van, Bakker P. 2006.** Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. *PGPR: Biocontrol and biofertilization*: 39–66.
- Lopareva-Pohu A, Verdín A, Garon G, Louns-Hadj Sahraoui A, Pourrut B, Debiane D, Waterlot C, Laruelle F, Bidar G, Douay F, et al. 2011.** Influence of fly ash aided phytostabilisation of Pb, Cd and Zn highly contaminated soils on *Lolium perenne* and *Trifolium repens* metal transfer and physiological stress. *Environmental Pollution* **159**: 1721–1729.
- Lu X, Liu Y, Johs A, Zhao L, Wang T, Yang Z, Lin H, Elias DA, Pierce EM, Liang L, et al. 2016.** Anaerobic Mercury Methylation and Demethylation by *Geobacter bemidjensis* Bem. *Environmental Science & Technology*: acs.est.6b00401.
- Lu Y, Shen Y, Warren W, Walter R. 2015.** Next Generation Sequencing in Aquatic Models. *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*: Chapter 2.
- Lucisine P, Echevarria G, Sterckeman T, Vallance J, Rey P, Benizri E. 2014.** Effect of hyperaccumulating plant cover composition and rhizosphere-associated bacteria on the efficiency of nickel extraction from soil. *Applied Soil Ecology* **81**: 30–36.
- Ma Y, Rajkumar M, Freitas H. 2009.** Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. *Chemosphere* **75**: 719–725.
- Ma Y, Rajkumar M, Luo Y, Freitas H. 2011.** Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants--effects on plant growth and Ni uptake. *Journal of hazardous materials* **195**: 230–7.
- Ma Y, Rajkumar M, Zhang C, Freitas H. 2016.** Inoculation of *Brassica oxyrrhina* with plant growth promoting bacteria for the improvement of heavy metal phytoremediation under drought conditions. *Journal of Hazardous Materials* **320**: 36–44.

- MacDiarmid CW, Gardner RC. 1998. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* metal transport system confers resistance to aluminum ion. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 1727–1732.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Ryu J, Sa T. 2006. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. *Planta* **224**: 268–78.
- Madrid Y, Cabrera C, Perez-Corona T, Camara C. 1995. Speciation of Methylmercury and Hg(II) Using Baker's Yeast Biomass (*Saccharomyces cerevisiae*). Determination by Continuous Flow Mercury Cold Vapor Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Chemistry* **67**: 750–754.
- Magos L, Halbach S, Clarkson TW. 1978. Role of catalase in the oxidation of mercury vapor. *Biochemical Pharmacology* **27**: 1373–1377.
- Mahbub KR, Krishnan K, Megharaj M, Naidu R. 2016a. Mercury Inhibits Soil Enzyme Activity in a Lower Concentration than the Guideline Value. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **96**: 76–82.
- Mahbub KR, Krishnan K, Naidu R, Andrews S, Megharaj M. 2017. Mercury toxicity to terrestrial biota. *Ecological Indicators* **74**: 451–462.
- Mahbub KR, Subashchandrabose SR, Krishnan K, Naidu R, Megharaj M. 2016b. Mercury alters the bacterial community structure and diversity in soil even at concentrations lower than the guideline values. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 1–13.
- Maignien L, DeForce E a., Chafee ME, Murat Eren a., Simmons SL. 2014. Ecological succession and stochastic variation in the assembly of Arabidopsis thaliana phyllosphere communities. *mBio* **5**: 1–10.
- Makonde HM, Mwirichia R, Osiemo Z, Boga HI, Klenk H-P. 2015. 454 Pyrosequencing-based assessment of bacterial diversity and community structure in termite guts, mounds and surrounding soils. *SpringerPlus* **4**: 471.
- Mantelin S, Touraine B. 2004. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of experimental botany* **55**: 27–34.
- Mark Ibekwe a., Kennedy AC, Halvorson JJ, Yang C-H. 2007. Characterization of developing microbial communities in Mount St. Helens pyroclastic substrate. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 2496–2507.
- Mattenberger F, Sabater-Muñoz B, Hallsworth JE, Fares MA. 2017. Glycerol stress in *Saccharomyces cerevisiae*: Cellular responses and evolved adaptations. *Environmental Microbiology* **19**: 990–1007.
- Maurhofer M, Hase C, Meuwly P. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA 0: Influence of the *gacA* gene. *Phytopathology* **84**: 139–146.
- Maxam a M, Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 560–4.
- Mehta S, Nautiyal CS. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology* **43**: 51–56.
- Mejstrik V, Lepsova A. 1993. Applicability of fungi to the monitoring of environmental pollution by heavy metals. *Plants as biomonitors*. VCH Verlagsgesellschaft,.
- Melgar MJ, Alonso J, García MA. 2009. Mercury in edible mushrooms and underlying soil: Bioconcentration factors and toxicological risk. *Science of the Total Environment* **407**: 5328–5334.
- Meng M, Li B, Shao J, Wang T, He B, Shi J, Ye Z, Jiang G. 2014. Accumulation of Total Mercury and Methylmercury in Rice Plants Collected from Different Mining Areas in China. *Environmental pollution*: 179–86.
- Menkis A, Burokiene D, Stenlid J, Stenström E. 2016. High-throughput sequencing shows high fungal diversity and community segregation in the rhizospheres of container-grown conifer seedlings. *Forests* **7**: 1–15.
- Mercier C, Boyer F, Bonin A, Coissac E. 2013. SUMATRA and SUMACLUSTR: fast and exact comparison and clustering of sequences. *Abstract In: SeqBio 25-26th Nov 2013*: 27.
- Meselson M, Stahl FW. 1956. The Replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **44**(7), 671–682.
- Metzker ML. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews. Genetics* **11**: 31–46.
- De Meyer SE, De Beuf K, Vekeman B, Willems A. 2015. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry* **83**: 1–11.
- Meyer M, Kircher M. 2010. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harbor Protocols* **5**.
- Miller SM. 2007. Cleaving C-Hg bonds: two thiolates are better than one. *Nature Chemical Biology* **3**: 537–538.
- Minagawa K, Sasaki T, Takizawa Y, Tamura R, Oshina T. 1980. Accumulation route and chemical form of mercury in mushroom species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **25**: 382–388.
- Moller AK, Barkay T, Hansen M a., Norman A, Hansen LH, Soslash;rensen SJ, Boyd ES, Kroer N. 2014. Mercuric reductase genes (*merA*) and mercury resistance plasmids in High Arctic snow, freshwater and sea-ice brine. *FEMS Microbiology Ecology* **87**: 52–63.
- Moreira H, Marques APGC, Franco AR, Rangel AOSS, Castro PML. 2014. Phytomanagement of Cd-contaminated soils using maize (*Zea mays* L.) assisted by plant growth-promoting rhizobacteria. *Environmental Science and Pollution Research* **21**: 9742–9753.
- Mrozik A, Piotrowska-Seget Z. 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological research* **165**: 363–75.
- Mukherjee AB, Zevenhoven R, Brodersen J, Hylander LD, Bhattacharya P. 2004. Mercury in waste in the European Union: Sources, disposal methods and risks. *Resources, Conservation and Recycling* **42**: 155–182.
- Müller A. 2001. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiology Ecology* **36**: 11–19.
- Müller AK, Rasmussen LD, Sørensen SJ. 2001. Adaptation of the bacterial community to mercury contamination. *FEMS Microbiology Letters*: 49–53.
- Muller AK, Wertergaard K, Christensen S, Sorensen SJ. 2001. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS microbiology ecology* **36**: 11–19.

- Murty MG. 1984. Phyllosphere of Cotton as a Habitat for Diazotrophic Microorganisms. *Applied and environmental microbiology* **48**: 713–718.
- Nadaliq T, Farhan Ul Haque M, Roselli S, Schaller H, Bringel F, Vuilleumier S. 2011. Detection and isolation of chloromethane-degrading bacteria from the Arabidopsis thaliana phyllosphere, and characterization of chloromethane utilization genes. *FEMS Microbiology Ecology* **77**: 438–448.
- Nagata T, Oobo T, Aozasa O. 2013. Efficacy of a bacterial siderophore, pyoverdine, to supply iron to Solanum lycopersicum plants. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **115**: 686–690.
- Nakamiya K, Nakayama T, Ito H, Shibata Y, Morita M. 2009. Isolation and properties of a 2-chlorovinylarsonic acid-degrading microorganism. *Journal of Hazardous Materials* **165**: 388–393.
- Nascimento AMA, Chartone-Souza E. 2003. Operon mer: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genetics and Molecular Research*: 92–101.
- Nasr M, Arp PA. 2011. Hg concentrations and accumulations in fungal fruiting bodies, as influenced by forest soil substrates and moss carpets. *Applied Geochemistry* **26**: 1905–1917.
- Nasr M, Arp PA. 2016. Biomonitoring and assessing total mercury concentrations and pools in forested areas. : 47–63.
- Nasr M, Malloch DW, Arp PA. 2012. Quantifying Hg within ectomycorrhizal fruiting bodies, from emergence to senescence. *Fungal Biology* **116**: 1163–1177.
- Navarrete AA, Tsai SM, Mendes LW, Faust K, De Hollander M, Cassman NA, Raes J, Van Veen JA, Kuramae EE. 2015. Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian deforestation. *Molecular Ecology* **24**: 2433–2448.
- Nguyen NH, Song Z, Bates ST, Branco S, Tedersoo L, Menke J, Schilling JS, Kennedy PG. 2015. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology* **20**: 241–248.
- Nihorimbere V, Ongena M. 2017. Isolation of plant growth-promoting Bacillus strains with biocontrol activity in vitro.
- Nkrumah PN, Baker AJM, Chaney RL, Erskine PD, Echevarria G, Morel JL, van der Ent A. 2016. Current status and challenges in developing nickel phytomining: an agronomic perspective. *Plant and Soil* **406**: 55–69.
- O'Sullivan DJ, O'Gara F. 1992. Traits of fluorescent Pseudomonas spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological reviews* **56**: 662–76.
- Oliveira ALM, Stoffels M, Schmid M, Reis VM, Baldani JI, Hartmann A. 2009. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *European Journal of Soil Biology* **45**: 106–113.
- Oomen AG, Rompelberg CJM, Bruil MA, Dobbe CJG, Pereboom DPKH, Sips AJAM. 2003. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **44**: 281–287.
- Oregaard G, Sørensen SJ. 2007. High diversity of bacterial mercuric reductase genes from surface and sub-surface floodplain soil (Oak Ridge, USA). *The ISME journal* **1**: 453–467.
- Osborn M, Bruce K, Strike P, Ritchie D. 1997. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury. *FEMS Microbiology Ecology* **19**: 239–262.
- Oyetibo GO, Ishola ST, Ikeda-Ohtsubo W, Miyauchi K, Ilori MO, Endo G. 2015. Mercury bioremoval by Yarrowia strains isolated from sediments of mercury-polluted estuarine water. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**: 3651–3657.
- Pacyna EG, Pacyna JM, Sundseth K, Munthe J, Kindbom K, Wilson S, Steenhuisen F, Maxson P. 2010. Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. *Atmospheric Environment* **44**: 2487–2499.
- Padda KP, Puri A, Chanway CP. 2016. Effect of GFP tagging of Paenibacillus polymyxa P2b-2R on its ability to promote growth of canola and tomato seedlings. *Biology and Fertility of Soils* **52**: 377–387.
- Paige Wright L, Zhang L, Marsik FJ. 2016. Overview of mercury dry deposition, litterfall, and throughfall studies. *Atmospheric Chemistry and Physics* **16**: 13399–13416.
- Pak K, Bartha R. 1998. Mercury Methylation and Demethylation in Anoxic Lake Sediments and by Strictly Anaerobic Bacteria Mercury Methylation and Demethylation in Anoxic Lake Sediments and by Strictly Anaerobic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(3), 1013-1017.
- Pal D, Sahu CK, Haldar A. 2014. Bhasma : The ancient Indian nanomedicine. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research* **5**: 4–12.
- Panagos P, Hiederer R, Van Liedekerke M, Bampa F. 2013. Review Article Contaminated Sites in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network. *Journal of Environmental and Public Health* **Artical ID**: 1–11.
- Pandey VC, Bajpai O, Singh N. 2016. Energy crops in sustainable phytoremediation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **54**: 58–73.
- Pandit V, Majumder D. 2014. Biosorption of Heavy Metals By Dead Fungal Biomass. **4**: 11–20.
- Pang CNI, Lai Y-W, Campbell LT, Chen SC-A, Carter DA, Wilkins MR. 2017. Transcriptome and network analyses in Saccharomyces cerevisiae reveal that amphotericin B and lactoferrin synergy disrupt metal homeostasis and stress response. *Scientific Reports* **7**: 40232.
- Park J, Song WY, Ko D, Eom Y, Hansen TH, Schiller M, Lee TG, Martinoia E, Lee Y. 2012. The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *Plant Journal* **69**: 278–288.
- Parks JM. 2013. The Genetic Basis for Bacterial Mercury Methylation. *Nature* **220**: 173–174.
- Parsons MB. 2015. A brief history of mercury and its environmental impact. *Mercury: sources, measurements, cycles, and effects*, **34**, 1-20.
- Pati BR. 1992. Effect of spraying nitrogen fixing phyllospheric bacterial isolates on rice plants. *Zentralblatt fur Mikrobiologie* **147**: 441–446.
- Pati BR, Chandra AK. 1981. Effect of spraying nitrogen-fixing phyllospheric bacterial isolates on wheat plants. *Plant and Soil* **74**: 643–652.
- Patten CL, Glick BR. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* **42**: 207–220.

- Pavlish JH, Sondreal EA, Mann MD, Olson ES, Galbreath KC, Laudal DL, Benson SA. 2003. Status review of mercury control options for coal-fired power plants. *Fuel Processing Technology* **82**: 89–165.
- Peay KG. 2014. Back to the future: Natural history and the way forward in modern fungal ecology. *Fungal Ecology* **12**: 4–9.
- Pedrero Z, Ouerdane L, Mounicou S, Lobinski R, Monperrus M, Amouroux D. 2012. Identification of mercury and other metals complexes with metallothioneins in dolphin liver by hydrophilic interaction liquid chromatography with the parallel detection by ICP MS and electrospray hybrid linear/orbital trap MS/MS. *Metallomics* **4**: 473.
- Peer R Van, Niemann G, Schippers B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by Pseudomonas sp. strain WCS 417 r. *Phytopathology*: 728–733.
- Peiffer JA, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangl JL, Buckler ES, Ley RE. 2013. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 6548–53.
- Penrose DM, Glick BR. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum* **118**: 10–15.
- Perazzolli M, Antonielli L, Storari M, Puopolo G, Pancher M, Giovannini O, Pindo M, Pertot I. 2014. Resilience of the natural phyllosphere microbiota of the grapevine to chemical and biological pesticides. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 3585–3596.
- Philer R, Voit A, Kothe E. 2010. Microbially supported phytoremediation of heavy metal contaminated soils: strategies and applications. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **123**: 127–141.
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH. 2013a. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 789–799.
- Philippot L, Spor A, Hénault C, Bru D, Bizouard F, Jones CM, Sarr A, Maron P-A. 2013b. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *The ISME Journal* **7**: 1609–1619.
- Pieterse CMJ, de Jonge R, Berendsen RL. 2016. The Soil-Borne Supremacy. *Trends in Plant Science* **21**: 171–173.
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* **52**: 347–375.
- Pilon-Smits E a. H, Souza MPD, Lytle CM, Shang C, Lugo T, Terry N. 1998. Selenium volatilization and assimilation by hybrid poplar (*Populus tremula* x *alba*). *Journal of Experimental Botany* **49**: 1889–1892.
- Piotrowski JK, Trojanowska B, Wisniewska-Knypl JM, Bolanowska W. 1974. Mercury binding in the kidney and liver of a rats repeatedly exposed to mercuric chloride: induction of metallothionein by mercury and cadmium. *Toxicology and Applied Pharmacology* **27**: 11–19.
- Pirrone N, Cinnirella S, Feng X, Finkelman RB, Friedli HR, Leaner J, Mason R, Mukherjee AB, Stracher GB, Streets DG, et al. 2010. Global mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic and natural sources. *Atmospheric Chemistry and Physics* **10**: 5951–5964.
- Pócsi I, Prade RA, Penninckx MJ. 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in microbial physiology*, 49(1.76).
- Podar M, Gilmour CC, Brandt CC, Soren A, Brown SD, Crable BR, Palumbo A V, Somenahally AC, Elias DA. 2015. Global prevalence and distribution of genes and microorganisms involved in mercury methylation. *Science Advances* **1**: 1–13.
- Poulain AJ, Aris-Brosou S, Blais JM, Brazeau M, Keller W (Bill), Paterson AM. 2015. Microbial DNA records historical delivery of anthropogenic mercury. *The ISME Journal*: 1–10.
- Prober SM, Leff JW, Bates ST, Borer ET, Firn J, Harpole WS, Lind EM, Seabloom EW, Adler PB, Bakker JD, et al. 2015. Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. *Ecology Letters* **18**: 85–95.
- Provencher JF, Mallory ML, Braune BM, Forbes MR, Gilchrist HG. 2014. Mercury and marine birds in Arctic Canada: effects, current trends, and why we should be paying closer attention. *Environmental Reviews* **22**: 244–255.
- Puglisi I, Faedda R, Sanzaro V, Lo Piero AR, Petrone G, Cacciola SO. 2012. Identification of differentially expressed genes in response to mercury I and II stress in *Trichoderma harzianum*. *Gene* **506**: 325–330.
- Qasim BH. 2015. Détermination, spéciation et biodisponibilité des éléments traces métalliques dans les sols contaminés et technosols. Thèse de doctorat. Université d'Orléans.
- Rainey PB. 1999. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environmental microbiology* **1**: 243–257.
- Rajapaksha RMCP, Bååth E, Ba E. 2004. Metal Toxicity Affects Fungal and Bacterial Activities in Soil Differently Metal Toxicity Affects Fungal and Bacterial Activities in Soil Differently. *Applied and environmental microbiology* **70**: 2966–2973.
- Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in biotechnology* **28**: 142–9.
- Rajkumar M, Sandhya S, Prasad MN V, Freitas H. 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology advances* **30**: 1562–74.
- Rangel W de M, de Oliveira Longatti SM, Ferreira PAA, Bonaldi DS, Guimarães AA, Thijs S, Weyens N, Vangronsveld J, Moreira FMS. 2017. Leguminosae native nodulating bacteria from a gold mine As-contaminated soil: multi-resistance to trace elements, and possible role in plant growth and mineral nutrition. *International Journal of Phytoremediation*: 00–00.
- Ranjard L, Nazaret S, Gourbière F, Thioulouse J, Linet P, Richaume A. 2000. A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg(II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. *FEMS Microbiology Ecology*: 107–115.
- Ranjard L, Richaume A, Jocteur-Monrozier L, Nazaret S. 1997. Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiology Ecology*: 321–331.
- Rasmussen LD, Sorensen SJ. 2001. Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *FEMS Microbiol Ecol* **36**: 1–9.
- Rasmussen LD, Sørensen SJ, Turner RR, Barkay T. 2000. Application of a mer-lux biosensor for estimating bioavailable mercury in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 639–646.
- Rastogi G, Coaker GL, Leveau JHJ. 2013. New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. *FEMS Microbiology Letters* **348**: 1–10.

- Redford AJ, Bowers RM, Knight R, Linhart Y, Fierer N. 2011.** The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environ Microbiol* **12**: 2885–2893.
- Redford AJ, Fierer N. 2009.** Bacterial succession on the leaf surface: A novel system for studying successional dynamics. *Microbial Ecology* **58**: 189–198.
- Rediers H, Rainey PB, Vanderleyden J, Mot R. 2005.** Unraveling the secret lives of bacteria: use in vivo expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69**: 217–261.
- Reed MLE, Warner BG, Glick BR. 2005.** Plant growth-promoting bacteria facilitate the growth of the common reed *Phragmites australis* in the presence of copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current microbiology* **51**: 425–9.
- Regier N, Baerlocher L, Münsterkötter M, Farinelli L, Cosio C. 2013.** Analysis of the *Elodea nuttallii* transcriptome in response to mercury and cadmium pollution: Development of sensitive tools for rapid ecotoxicological testing. *Environmental Science and Technology* **47**: 8825–8834.
- Regvar M, Likar M, Piltaver A, Kugonič N, Smith JE. 2010.** Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: the potential of screening in a model phytostabilisation study. *Plant and Soil* **330**: 345–356.
- Reisberg EE, Hildebrandt U, Riederer M, Hentschel U. 2013.** Distinct phyllosphere bacterial communities on *Arabidopsis* wax mutant leaves. *PLoS ONE* **8**.
- Remus-Emsermann MN, Leveau JH. 2010.** Linking environmental heterogeneity and reproductive success at single-cell resolution. *The ISME Journal* **4**: 215–222.
- Remus-Emsermann MNP, Tecon R, Kowalchuk GA, Leveau JHJ. 2012.** Variation in local carrying capacity and the individual fate of bacterial colonizers in the phyllosphere. *The ISME Journal* **6**: 756–765.
- Rieder SR, Brunner I, Horvat M, Jacobs A, Frey B. 2011.** Accumulation of mercury and methylmercury by mushrooms and earthworms from forest soils. *Environmental Pollution* **159**: 2861–2869.
- Rieder SR, Frey B. 2013.** Methyl-mercury affects microbial activity and biomass, bacterial community structure but rarely the fungal community structure. *Soil Biology and Biochemistry* **64**: 164–173.
- Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E. 2005.** *Paenibacillus phyllosphaerae* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the phyllosphere of *Phoenix dactylifera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 743–746.
- Rodríguez H, Fraga R. 1999.** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances* **17**: 319–39.
- Rollin C, Quiot F. 2006.** Eléments traces métalliques - guide méthodologique : recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. *Rapport d'étude INERIS*: 138 p.
- Romeo S, Francini A, Ariani A, Sebastiani L. 2014.** Phytoremediation of Zn: Identify the diverging resistance, uptake and biomass production behaviours of poplar clones under high zinc stress. *Water, Air, and Soil Pollution* **225**.
- Rothberg JM, Leamon JH. 2008.** The development and impact of 454 sequencing. *Nature biotechnology* **26**: 1117–1124.
- Ruggiero P, Terzano R, Spagnuolo M, Cavalca L, Colombo M, Andreoni V, Rao M a, Perucci P, Monaci E. 2011.** Hg bioavailability and impact on bacterial communities in a long-term polluted soil. *Journal of environmental monitoring : JEM* **13**: 145–156.
- Ruinen J. 1961.** The phyllosphere. *Plant and Soil* **15**: 81–109.
- Saba M, Falandysz J, Nnorom IC. 2016.** Mercury bioaccumulation by *Suillus bovinus* mushroom and probable dietary intake with the mushroom meal. *Environmental Science and Pollution Research* **23**: 14549–14559.
- Safronova VI, Stepanok V V., Engqvist GL, Alekseyev Y V., Belimov A a. 2005.** Root-associated bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase improve growth and nutrient uptake by pea genotypes cultivated in cadmium supplemented soil. *Biology and Fertility of Soils* **42**: 267–272.
- Saharan B, Nehra V. 2011.** Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res* **2011**: 1–30.
- Sandhu A, Halverson LJ, Beattie G a. 2009.** Identification and genetic characterization of phenol-degrading bacteria from leaf microbial communities. *Microbial Ecology* **57**: 276–285.
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson a R, Fiddes C a, Hutchison C a, Slocombe PM, Smith M. 1977.** Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**: 687–695.
- Sanglimsuwan S, Yoshida N, Morinaga T, Murooka Y. 1993.** Resistance to and uptake of heavy metals in mushrooms. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **75**: 112–114.
- Dos Santos Utmazian MN, Wieshammer G, Vega R, Wenzel WW. 2007.** Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars. *Environmental Pollution* **148**: 155–165.
- Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, del Carmen Orozco-Mosqueda M, Glick BR. 2016.** Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research* **183**: 92–99.
- Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. 2010.** A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics* **19**: 227–240.
- Scheublin TR, Leveau JHJ. 2013.** Isolation of *Arthrobacter* species from the phyllosphere and demonstration of their epiphytic fitness. *MicrobiologyOpen* **2**: 205–13.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, et al. 2009.** Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 7537–7541.
- Schmid M, Rothballer M, Hartmann A. 2007.** Analysis of microbial communities in soil microhabitats using fluorescence in situ hybridization. *Modern Soil Microbiology II, CRC-Press, Boca*.
- Schneider J, Stürmer SL, Guilherme LRG, De Souza Moreira FM, Soares CRFDS. 2013.** Arbuscular mycorrhizal fungi in arsenic-contaminated areas in Brazil. *Journal of Hazardous Materials* **262**: 1105–1115.
- Schwyn B, Neilands JB. 1987.** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* **160**: 47–56.

- Sessitsch A, Kuffner M, Kidd P, Vangronsveld J, Wenzel WW, Fallmann K, Puschenreiter M. 2013a. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* **60**: 182–194.
- Sessitsch A, Kuffner M, Kidd P, Vangronsveld J, Wenzel WW, Fallmann K, Puschenreiter M. 2013b. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil biology & biochemistry* **60**: 182–194.
- Shakya M, Gottel N, Castro H, Yang ZK, Gunter L, Labbé J, Muchero W, Bonito G, Vilgalys R, Tuskan G, et al. 2013. A multifactor analysis of fungal and bacterial community structure in the root microbiome of mature *Populus deltoides* trees. *PloS one* **8**: e76382.
- Sharma A, Johri BN. 2003. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiological research* **158**: 243–8.
- Sharpton TJ. 2014. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in Plant Science* **5**: 209.
- Shi S, Nuccio E, Herman DJ, Rijkers R, Estera K, Li J, Nunes da Rocha U, He Z, Pett-Ridge J, Brodie EL, et al. 2015. Successional Trajectories of Rhizosphere Bacterial Communities over. *Mbio* **6**: 13–20.
- Smets W, Wuyts K, Oerlemans E, Wuyts S, Denys S, Samson R, Lebeer S. 2016. Impact of urban land use on the bacterial phyllosphere of ivy (*Hedera* sp.). *Atmospheric Environment* **147**: 376–383.
- Sopko R, Huang D, Preston N, Chua G, Papp B, Kafadar K, Snyder M, Oliver SG, Cyert M, Hughes TR, et al. 2006. Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Molecular Cell* **21**: 319–330.
- Standage DS, Berens AJ, Glastad KM, Severin AJ, Brendel VP, Toth AL. 2016. Genome, transcriptome and methylome sequencing of a primitively eusocial wasp reveal a greatly reduced DNA methylation system in a social insect. *Molecular Ecology* **25**: 1769–1784.
- Steffen A, Douglas T, Amyot M, Ariya P, Aspmo K, Berg T, Bottenheim J, Brooks S, Cobbett F. 2008. and Physics A synthesis of atmospheric mercury depletion event chemistry in the atmosphere and snow. *Atmospheric Chemistry and Physics* **8**: 1445–1482.
- Stern GA, Macdonald RW, Outridge PM, Wilson S, Chételat J, Cole A, Hintelmann H, Loseto LL, Steffen A, Wang F, et al. 2012. How does climate change influence arctic mercury? *Science of the Total Environment* **414**: 22–42.
- Stijve T, Besson R. 1976. Mercury, cadmium, lead and selenium content of mushroom species belonging to the genus *agaricus*. *Chemosphere*: 151–158.
- Stratton WJ, Lindberg SE. 1995. Use of a refluxing mist chamber for measurement of gas-phase mercury(II) species in the atmosphere. *Water, Air, & Soil Pollution* **80**: 1269–1278.
- Suh JH, Kim DS. 2000. Effects of hg<sup>2+</sup> and cell conditions on Pb<sup>2+</sup> accumulation by *saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Engineering* **23**: 327–329.
- Sun PF, Fang WT, Shin LY, Wei JY, Fu SF. 2014a. Indole-3-Acetic Acid-Producing Yeasts in the Phyllosphere of the Carnivorous Plant. *PloS one*, *9*(12), e114196.
- Sun C, Geng L, Wang M, Shao G, Liu Y, Shu C, Zhang J. 2017. No adverse effects of transgenic maize on population dynamics of endophytic *Bacillus subtilis* strain B916-gfp. *MicrobiologyOpen* **6**: 1–6.
- Sun K, Liu J, Gao Y, Jin L, Gu Y, Wang W. 2014b. Isolation, plant colonization potential, and phenanthrene degradation performance of the endophytic bacterium *Pseudomonas* sp. Ph6-gfp. *Scientific reports* **4**: 5462.
- Sut M, Boldt-Burisch K, Raab T. 2016. Possible evidence for contribution of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in phytoremediation of iron–cyanide (Fe–CN) complexes. *Ecotoxicology* **25**: 1260–1269.
- Svoboda L, Zimmermannová K, Kalač P. 2000. Concentrations of mercury, cadmium, lead and copper in fruiting bodies of edible mushrooms in an emission area of a copper smelter and a mercury smelter. *Science of the Total Environment* **246**: 61–67.
- Sy A, Timmers ACJ, Knief C, Vorholt J a. 2005. Methylotrophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Applied and environmental microbiology* **71**: 7245–52.
- Takeuchi F, Iwahori K, Kamimura K, Negishi A, Maeda T, Sugio T. 2001. Volatilization of mercury under acidic conditions from mercury-polluted soil by a mercury-resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* SUG 2-2. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 1981–1986.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731–2739.
- Tardy V, Mathieu O, Lévêque J, Terrat S, Chabbi A, Lemanceau P, Ranjard L, Maron PA. 2014. Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity. *Environmental Microbiology Reports* **6**: 173–183.
- Tedersoo L, Anslan S, Bahram M, Põlme S, Riit T, Liiv I, Kõljalg U, Kisand V, Nilsson H, Hildebrand F, et al. 2015. Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycKeys* **10**: 1–43.
- Tedersoo L, Bahammad B, Polme S, Koljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, Ruiz LV, Vasco-Palacios AM, Quang Thu P, Suija A, et al. 2014a. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* **346**: 1256688.
- Tedersoo L, Bahram M, Dickie IA. 2014b. Does host plant richness explain diversity of ectomycorrhizal fungi? Re-evaluation of Gao et al. (2013) data sets reveals sampling effects. *Molecular Ecology* **23**: 992–995.
- Tham LX, Matsushashi S, Kume T. 1999. Responses of *Ganoderma lucidum* to heavy metals. *Mycoscience* **40**: 209–213.
- Thomassin JF, Touze S. 2003. Le mercure et ses composés Comportement dans les sols, les eaux et les boues de sédiments. *Brgm*: 1–121.
- Thompson IP, Bailey MJ, Fenlon JS, Fermor TR, Lilley AK, Lynch JM, McCormack PJ, McQuilken MP, Purdy KJ, Rainey PB, et al. 1993. Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant and Soil* **150**: 177–191.

- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994.** ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673–4680.
- Trapet P, Avoscan L, Klinguer A, Pateyron S, Citerne S, Chervin C, Mazurier S, Lemanceau P, Wendehenne D, Besson-Bard A. 2016.** The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis thaliana* defense in favour of growth in iron-deficient conditions. *Plant physiology* **171**: pp.15.01537-.
- Trouvelot S, HÃ©loir M-C, Poinssot B, Gauthier A, Paris F, Guillier C, Combier M, TrdÃ; L, Daire X, Adrian M. 2014.** Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1–14.
- Ullah A, Heng S, Munis MFH, Fahad S, Yang X. 2015.** Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environmental and Experimental Botany* **117**: 28–40.
- Unterseher M, Jumpponen A, Öpik M, Tedersoo L, Moora M, Dormann CF, Schnittler M. 2011.** Species abundance distributions and richness estimations in fungal metagenomics - Lessons learned from community ecology. *Molecular Ecology* **20**: 275–285.
- Urbina H, Scofield DG, Cafaro M, Rosling A. 2015.** DNA-metabarcoding uncovers the diversity of soil-inhabiting fungi in the tropical island of Puerto Rico. *Mycoscience* **57**: 217–227.
- Urik M, Hlodák M, Mikušová P, Matúš P. 2014.** Potential of microscopic fungi isolated from mercury contaminated soils to accumulate and volatilize mercury(II). *Water, Air, and Soil Pollution* **225**.
- Vacher C, Hampe A, Porté A, Sauer U, Compant S, Morris CE. 2016.** The phyllosphere: microbial jungle at the plant-climate interface. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*: 47:1–24.
- Vanderhoef LN, Dute RR. 1981.** Auxin-regulated Wall Loosening and Sustained Growth in Elongation. *Plant Physiology* **67**: 146–9.
- Vessey J. 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*: 571–586.
- Vetriani C, Chew YS, Miller SM, Yagi J, Coombs J, Lutz RA, Barkay T. 2005.** Mercury Adaptation among Bacteria from a Deep-Sea Hydrothermal Vent. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 220–226.
- Vick-Majors TJ, Priscu JC, Amaral-Zettler L a. 2014.** Modular community structure suggests metabolic plasticity during the transition to polar night in ice-covered Antarctic lakes. *The ISME journal* **8**: 778–89.
- Vijayaraghavan K, Balasubramanian R. 2015.** Is biosorption suitable for decontamination of metal-bearing wastewaters? A critical review on the state-of-the-art of biosorption processes and future directions. *Journal of Environmental Management* **160**: 283–296.
- Vonk JW, Sijpesteijn AK. 1973.** Studies on the methylation of mercuric chloride by pure cultures of bacteria and fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* **39**: 505–513.
- Vorholt JA. 2012.** Microbial life in the phyllosphere. *Nature reviews. Microbiology* **10**: 828–40.
- Walter C, Bispo A, Chenu C, Langlais-Hesse A, Schwartz C. 2014.** Les services écosystémiques des sols : du concept à sa valorisation. *Cahier Demeter*: 51–68.
- Wang Y. 2004.** Phytoremediation of mercury by terrestrial plants. Thèse de doctorat. Botaniska institutionen.
- Wang J, Chen C. 2006.** Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances* **24**: 427–451.
- Wang J, Feng X, Anderson CWN, Xing Y, Shang L. 2012a.** Remediation of mercury contaminated sites - A review. *Journal of Hazardous Materials* **221–222**: 1–18.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. 2007.** Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5261–5267.
- Wang D, Yang S, Tang F, Zhu H. 2012b.** Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology* **14**: 334–342.
- Wang NF, Zhang T, Zhang F, Wang ET, He JF, Ding H, Zhang BT, Liu J, Ran X Bin, Zang JY. 2015.** Diversity and structure of soil bacterial communities in the Fildes Region (maritime Antarctica) as revealed by 454 pyrosequencing. *Frontiers in Microbiology* **6**: 1–11.
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Metraux JP, Ryals J a. 1991.** Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. *The Plant cell* **3**: 1085–1094.
- Watson JD, Crick FH. 1953.** The structure of DNA. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **18**: 123–131.
- Weiss S, Van Treuren W, Lozupone C, Faust K, Friedman J, Deng Y, Xia LC, Xu ZZ, Ursell L, Alm EJ, et al. 2016.** Correlation detection strategies in microbial data sets vary widely in sensitivity and precision. *The ISME journal*.
- Whipps JM, Hand P, Pink D, Bending GD. 2008.** Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of applied microbiology* **105**: 1744–55.
- Wiejak A, Wang Y, Zhang J, Falandysz J. 2014.** Bioconcentration potential and contamination with mercury of pantropical mushroom *Macroclype gigantea*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **49**: 811–814.
- Wisniak J. 2008.** The history of mercury. From discovery to incommmodity. *Revista CENIC Ciencias Químicas* **39**: 147–157.
- Wondratschek I, Röder U. 1993.** Monitoring of heavy metals in soils by higher fungi. *Plants as biomonitors. Indicators for heavy metals in the terrestrial environment. VCH, Weinheim*, 345–363.
- Work TT, Jacobs JJ, Spence JR, Volney WJ a. 2010.** Higher levels of variable retention required to maintain ground beetle biodiversity in boreal mixedwood forests. *Ecological Applications* **20**: 741–751.
- Xie H, Pasternak JJ, Glick BR. 1996.** Isolation and Characterization of Mutants of the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 That Overproduce Indoleacetic Acid. *Current Microbiology* **32**: 67–71.
- Xu R, Li T, Cui H, Wang J, Yu X, Ding Y, Wang C, Yang Z, Zhao Z. 2015.** Diversity and characterization of Cd-tolerant dark septate endophytes (DSEs) associated with the roots of Nepal alder (*Alnus nepalensis*) in a metal mine tailing of southwest China. *Applied Soil Ecology* **93**: 11–18.
- Yang J, Kloepper JW, Ryu C-M. 2009.** Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* **14**: 1–4.



- Yang Y, Liang Y, Han X, Chiu T, Ghosh A, Chen H. 2016.** The roles of arbuscular mycorrhizal fungi ( AMF ) in phytoremediation and tree-herb interactions in Pb contaminated soil. *Nature Publishing Group*: 1–14.
- Yang M, Mavrodi D V., Mavrodi O V., Thomashow LS, Weller DM. 2017.** Construction of a recombinant strain of *Pseudomonas fluorescens* producing both phenazine-1-carboxylic acid and cyclic lipopeptide for the biocontrol of take-all disease of wheat. *European Journal of Plant Pathology*: 1–12.
- Yu RQ, Flanders JR, MacK EE, Turner R, Mirza MB, Barkay T. 2012.** Contribution of coexisting sulfate and iron reducing bacteria to methylmercury production in freshwater river sediments. *Environmental Science and Technology* **46**: 2684–2691.
- Yuan ZL, Zhang CL, Lin FC, Kubicek CP. 2010.** Identity, Diversity, and Molecular Phylogeny of the Endophytic Mycobiota in the Roots of Rare Wild Rice (*Oryza granulate*) from a Nature Reserve in Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 1642–1652.
- Yutthammo C, Thongthammachat N, Pinphanichakarn P, Luepromchai E. 2010.** Diversity and activity of pah-degrading bacteria in the phyllosphere of ornamental plants. *Microbial Ecology* **59**: 357–368.
- Zappelini C, Karimi B, Foulon J, Lacerat-Didier L, Maillard F, Valot B, Blaudez D, Cazaux D, Gilbert D, Yergeau E, et al. 2015.** Diversity and complexity of microbial communities from a chlor-alkali tailings dump. *Soil Biology and Biochemistry* **90**: 101–110.
- Zhalnina K, Dias R, de Quadros PD, Davis-Richardson A, Camargo FAO, Clark IM, McGrath SP, Hirsch PR, Triplett EW. 2014.** Soil pH Determines Microbial Diversity and Composition in the Park Grass Experiment. *Microbial Ecology* **69**: 395–406.
- Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G. 2011.** The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics* **38**: 95–109.
- ZHANG F, Dashti N, Hynes R, SMITH D. 1996.** Plant growth promoting rhizobacteria and soybean nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. *Annals of Botany*: 453–459.
- Zhang T, Jia RL, Yu LY. 2016.** Diversity and distribution of soil fungal communities associated with biological soil crusts in the southeastern Tengger Desert (China) as revealed by 454 pyrosequencing. *Fungal Ecology* **23**: 156–163.
- Zhao D, Huang R, Zeng J, Yu Z, Liu P, Cheng S, Wu QL. 2014.** Pyrosequencing analysis of bacterial community and assembly in activated sludge samples from different geographic regions in China. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: 9119–9128.
- Zhou J, Wang Z, Sun T, Zhang H, Zhang X. 2016.** Mercury in terrestrial forested systems with highly elevated mercury deposition in southwestern China: The risk to insects and potential release from wildfires. *Environmental Pollution* **212**: 188–196.
- Zhu W, Lin CJ, Wang X, Sommar J, Fu X, Feng X. 2016.** Global observations and modeling of atmosphere-surface exchange of elemental mercury: A critical review. *Atmospheric Chemistry and Physics* **16**: 4451–4480.
- Zhuang X, Chen J, Shim H, Bai Z. 2007.** New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment international* **33**: 406–13.
- Žifčáková L, Větrovský T, Howe A, Baldrien P. 2016.** Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter. *Environmental Microbiology* **18**: 288–301.



## Alexis DURAND

**Titre :** DIVERSITE ET CARACTERISATION FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES INFEODEES AU PEUPLIER ISSUES D'UNE FRICHE INDUSTRIELLE ENRICHI EN MERCURE

**Mots clés :** Diversité microbienne, Mercure, Phytomanagement, Métabarcoding, Bactéries promotrices de croissance des plantes, Résistance et accumulation du mercure

**Résumé :** Le sol possède un capital naturel qui lui confère la capacité à produire des services écosystémiques, il est indispensable à la Vie telle que nous la connaissons et au développement des activités humaines. Cependant les activités anthropiques et les pollutions, notamment par les éléments traces métalliques (ETMs) tels que le mercure (Hg), perturbent les sols et modifient en profondeur l'organisation des écosystèmes.

Face à ces enjeux, des projets de remédiation et de gestion des sites et sols pollués se sont multipliés durant les dernières décennies en vue de futures ré-exploitations de ces sols.

Mes travaux ont permis l'exploration de la diversité des communautés de microorganismes associées à une plantation de peuplier sur un site géré par phytomanagement et contaminé par le Hg, *via* l'isolement de microorganismes et de leur ADN. Par ailleurs, la compréhension des mécanismes cellulaires liés à l'accumulation de Hg par les microorganismes a été un de mes sujets d'étude. Pour conclure, cette thèse ambitionne d'être un travail de référence pour les futurs projets de phytomanagement en milieu contaminé par le Hg, mettant en avant le rôle fondamental des microorganismes.

**Title :** DIVERSITY AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF MICROBIAL COMMUNITIES OF POPLAR FROM AN TAILING DUMP ENRICHED IN MERCURY

**Keywords :** Microbial diversity, Mercury, Phytomanagement, Metabarcoding, Plant growth promoting bacteria, Mercury resistance and accumulation

**Abstract:** Soil has a natural capital that gives it the capacity to produce ecosystem services, cultural as well as regulation or supply, it is essential to the Life as we know it. However, anthropogenic activities and pollutions like Trace Elements (TEs) such as mercury (Hg), changes soils and deeply modified ecosystem organization. Facing these challenges, remediation and management projects for polluted sites and soils have emerged during the last decades with a view to future re-exploitation of these soils.

My Ph-D work explored the diversity of microorganism communities associated with a poplar plantation at an Hg contaminated-site managed by phytomanagement, combining DNA-based approaches and conventional culture-based techniques. Understanding the cellular mechanisms related to the accumulation of Hg by microorganisms was also one of my objectives. In conclusion, this work aimed to be a reference for future phytomanagement project in Hg-contaminated sites, depicting microorganisms as essential actors.