

Collégium Sciences et Technologies  
Ecole Doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement

## Thèse

présentée pour l'obtention du titre de  
Docteur de l'Université de Lorraine  
en Biologie Végétale et Forestière

par Laurence LACERCAT-DIDIER

# Filtration biologique pour la réduction des éléments traces métalliques dans la biomasse du peuplier

Soutenue publiquement le 5 juin 2013

Directeur de thèse : Pr Michel CHALOT  
Co-directeur de thèse : Dr Damien BLAUDEZ

### Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Pierre BERTHOMIEU	Professeur, SupAgro, Montpellier
	M. Daniel WIPF	Professeur, Université de Bourgogne
Examineurs :	Mme Valérie BERT	Ingénieur de recherche, INERIS, Verneuil-en-Halatte
	M. Damien BLAUDEZ	Maitre de conférences, Université de Lorraine
	Mme Frédérique CADIERE	Ingénieur, ADEME, Angers
	M. Michel CHALOT	Professeur, Université de Franche-Comté



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

# Remerciements

---

Me voici donc rendue au difficile exercice des remerciements, difficile car il me semble important de trouver les mots justes pour chacun afin d'exprimer au mieux ma gratitude envers toutes les personnes ayant contribué à ce travail, et je ne voudrais oublier ou vexer personne. C'est pourquoi, j'aimerais tout d'abord remercier toutes les personnes qui n'apparaîtraient pas dans ces pages et qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Je souhaiterais tout d'abord remercier la région Lorraine et l'ADEME qui ont permis la réalisation de ce travail en m'apportant un cadre administratif, ainsi qu'un soutien financier sans lesquels rien n'aurait été possible.

Je voudrais également remercier vivement les membres du jury de ma soutenance : Pierre Berthomieu, Daniel Wipf, Valérie Bert, Frédérique Cadière, Michel Chalot et Damien Blaudez, pour avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens particulièrement à remercier Michel Chalot et Damien Blaudez, mes directeurs de thèse, pour m'avoir proposé cette thèse et m'avoir fait confiance durant ces quelques années passées ensemble. Merci pour votre soutien, vos conseils avisés et la marge de liberté que vous m'avez accordés au cours de ce travail. Je n'aurais pas pu souhaiter mieux comme encadrants.

Mes remerciements s'adressent également aux personnes ayant participé à mes comités de pilotage de thèse : Valérie Bert, Frédérique Cadière, Eric Gelhaye et Amandine Uhmann. Merci pour vos précieux conseils et votre soutien qui m'auront permis d'améliorer la qualité de mon travail.

Je voudrais ensuite remercier tous mes collègues de l'UMR 1136 IAM et notamment leurs directeurs Eric Gelhaye, Pascale Frey-Klett et Pascal Frey.

Plus particulièrement, je tiens à remercier les membres de l'équipe du « 4 » :

- Elena pour ta gentillesse, ta patience et ton aide précieuse que ce soit pour la rédaction de publis ou m'expliquer des points de protocoles ;
- Didier pour ton travail de thèse qui m'aura apporté des bases solides mais également pour tous les bons moments passés, notamment nos parties de « 7<sup>th</sup> sea » ;
- Aude pour ton travail sur le peuplier et aussi pour m'avoir grandement aidée à améliorer mon relationnel et à finaliser mon choix professionnel ;
- Hélène pour tes travaux sur les Zips et Cdfs et surtout ta bonne humeur et ton dynamisme ;
- Frédéric pour ces heures de lavage ou de broyage de végétaux passées ensemble où tu n'as jamais manqué de me raconter les derniers potins ;
- Chantal pour ton aide pour m'y retrouver dans les méandres de l'administratif et pour avoir participé à l'animation de notre bureau ;
- M. Botton pour votre gentillesse et l'intérêt porté à mon travail ;
- Eva, Annick et Claire pour m'avoir mis sur les rails pendant mes stages de master ;
- Loïc pour ta curiosité insatiable et tous tes trucs et astuces dignes de Géo Trouvetou ;

- Julie pour ton aide précieuse en fin de thèse et tes délicieux cookies, bon courage pour la suite ;
- Et les stagiaires ayant participé à l'avancement de mes travaux et sans qui je n'aurais pas pu réaliser tout ceci : Leila, Audrey, Denis, Arnaud, Maxime, Charlotte, Aurélien et Louis.

J'aimerais également remercier d'autres membres de l'UMR pour leur aide. Merci à l'équipe du « 3 » pour m'avoir plusieurs fois dépannée quand j'étais à cours de certains produits. Merci également à Valérie pour tes conseils en microscopie et ton énergie, et à Marc et Claude pour votre aide et vos conseils sur l'analyse moléculaire des communautés fongiques. Je n'oublie pas non plus Aurore, Benjamin et Edgar pour toutes les soirées bien sympas passées ensemble.

Un grand merci à Pierre Richaud pour toutes les analyses ICP effectuées dont la rapidité m'a toujours impressionnée.

Merci également à Michel Mench pour m'avoir envoyé des carpophores en début de thèse et m'avoir pris sous son aile à Portland.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres du projet BIOFILTREE pour vos conseils et les bons moments passés sur le terrain à planter des peupliers et des aulnes.

Un grand merci aux membres du LIMOS/LIEC pour leur accueil chaleureux en cette fin de thèse. Particulièrement, merci à Corinne Leyval pour m'avoir accepté au laboratoire et trouvé une petite place. Merci aussi à l'équipe du LGM/Dynamic pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis d'effectuer six mois d'ATER.

Et merci à Boulet pour m'avoir autorisé à utiliser sa dédicace.

Enfin, ayant parfois réussi à échapper au labo, j'aimerais profiter de ces quelques lignes pour remercier mes proches. Merci à mes parents et à mon frère pour leur soutien et leur intérêt. Un grand merci à mes amis (ils se reconnaîtront) pour avoir su me changer les idées quand j'en avais le plus grand besoin. Et enfin, Rémi, je te remercie du fond du cœur, il y aurait tellement à dire, mais surtout merci pour ta grande patience.

# Résumé/Abstract

---

**Résumé :** La phytostabilisation est une méthode de gestion de sites pollués par des éléments traces métalliques (ETM) grâce à une approche « verte ». Les champignons mycorrhiziens, associés aux racines, peuvent contribuer au potentiel de phytostabilisation d'espèces ligneuses en réduisant notamment le transfert des ETM vers les parties aériennes de la plante.

Dans le cadre du projet BIOFILTREE, plusieurs approches ont été mises en oeuvre afin de sélectionner des espèces fongiques performantes en phytostabilisation. Dans un premier temps, afin de cibler des espèces d'intérêt, les communautés fongiques associées aux racines de plusieurs clones de peupliers sur un site pollué par des ETM ont été analysées. Tous les peupliers étaient colonisés par des champignons ecto-, endomycorhiziens et endophytes. En revanche, des spécificités d'hôtes ont été observées parmi ces communautés, avec par exemple un champignon majoritaire du genre *Hebeloma*, mais ne s'associant pas avec tous les génotypes de peuplier. Dans un deuxième temps, plusieurs campagnes de prélèvements de champignons sur divers sites pollués ont permis d'isoler des souches fongiques particulièrement tolérantes aux ETM. De très fortes variations intra- et interspécifiques ont été observées lors de ces tests. Un test préliminaire en conditions contrôlées a également mis en évidence une légère modification de la répartition des ETM dans la biomasse du peuplier par un inoculum fongique.

En parallèle, des approches ciblées de caractérisation fonctionnelle (complémentation de levures, localisation subcellulaire de protéines chimériques avec la GFP, régulation transcriptionnelle, contenu métallique des cellules) de gènes impliqués dans l'homéostasie et la tolérance au zinc ont été mises en oeuvre chez *Laccaria bicolor*, un champignon ectomycorhizien modèle. L'homéostasie et la tolérance aux ETM sont liées entre autres à l'activité des transporteurs des familles ZIP (*Zrt-, Irt- related Protein*) et CDF (*Cation Diffusion Facilitator*). L'étude des membres appartenant à ces deux familles a permis d'affiner la compréhension des mécanismes d'absorption et de séquestration des ETM dans les hyphes des champignons ectomycorhiziens.

**Mots clés :** phytostabilisation, éléments traces métalliques, champignons mycorrhiziens, pollution, tolérance, *Laccaria bicolor*, zinc

**Abstract:** Phytostabilization is a gentle management option for sites polluted by trace elements (TE). Mycorrhizal fungi could assist plants in stabilizing pollutants by increasing the soil-prospected volume and by immobilizing MTE in their hyphae.

Within the BIOFILTREE project, several approaches were used to select fungal strains that could be used for enhancing the phytostabilization process. Firstly, the mycorrhizal status of roots of three poplar clones from a TE-polluted site and the fungi associated with the roots were analyzed. The roots were colonized by endomycorrhizal, ectomycorrhizal, and endophytic fungi. Our data also revealed some specific trends, *i.e.* *Hebeloma* species was not associated with all poplar genotypes. Secondly, several fungal strains were isolated from polluted sites and their *in vitro* tolerance to TE was tested. There was a strong inter- and intra-specific variation in metal tolerance. In a greenhouse study, two poplar clones were inoculated with an endomycorrhizal inoculum and grown on a TE-polluted soil. A slight modification in TE accumulation in shoots was observed.

In parallel, the role of ZIP (*Zrt-Irt- like Proteins*) and CDF (*Cation Diffusion Facilitator*) proteins in TE homeostasis/tolerance was also studied in the ectomycorrhizal model fungus *Laccaria bicolor*. The corresponding proteins were functionally characterized by the use of different approaches (yeast complementation, GFP-chimeric proteins, transcript analyses, cell metal content analyses). This study allowed us to better understand the mechanisms underlying zinc uptake and compartmentation in the hyphae of this fungus.

**Key-words:** phytostabilization, trace elements, mycorrhizal fungi, pollution, tolerance, *Laccaria bicolor*, zinc

# Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviations

**Synthèse bibliographique..... 1**

**1. Les éléments traces métalliques dans les sols..... 3**

- 1.1. Les éléments traces métalliques ..... 3
- 1.2. Origine des éléments traces métalliques dans les sols ..... 5
  - 1.2.1. Origine naturelle..... 5
  - 1.2.2. Origine anthropique ..... 7
- 1.3. Comportement des éléments trace métalliques dans les sols..... 7
- 1.4. La pollution des sols par les éléments trace métalliques..... 11
  - 1.4.1. Sites et sols pollués en France ..... 11
  - 1.4.2. Normes de pollution et évaluation des risques..... 13
- 1.5. Impacts de la pollution aux ETM sur les organismes terrestres..... 17
  - 1.5.1. Effets cellulaires des ETM ..... 17
    - 1.5.1.1. Altération des membranes cellulaires..... 17
    - 1.5.1.2. Interactions avec les acides nucléiques ..... 19
    - 1.5.1.3. Inhibition d'enzymes..... 19
  - 1.5.2. Toxicité des ETM au niveau des organismes ..... 21
    - 1.5.2.1. Toxicité pour l'homme ..... 21
    - 1.5.2.2. Phytotoxicité ..... 23
    - 1.5.2.3. Toxicité pour les micro-organismes du sol..... 23
      - 1.5.2.3.1. Toxicité pour les champignons ..... 23
      - 1.5.2.3.2. Toxicité pour les bactéries ..... 25

**2. Réhabilitation et remédiation des sites pollués ..... 27**

- 2.1. Techniques thermiques et physico-chimiques..... 27
  - 2.1.1. Désorption thermique ..... 27
  - 2.1.2. Tris physiques ou physico-chimiques ..... 27
  - 2.1.3. Lavages par agents chimiques ou tensio-actifs ..... 29
  - 2.1.4. Stabilisation physico-chimique..... 31
- 2.2. Techniques biologiques..... 31
  - 2.2.1. Bio-immobilisation ..... 31
  - 2.2.2. Biolixiviation ..... 33
  - 2.2.3. Phytoremédiation..... 33
    - 2.2.3.1. Phytovolatilisation..... 35
    - 2.2.3.2. Phytoextraction..... 39
    - 2.2.3.3. Phytostabilisation..... 43

**3. La phytostabilisation ..... 45**

- 3.1. Choix de l'espèce végétale ..... 45
- 3.2. Amélioration du potentiel de phytostabilisation des plantes ..... 49
  - 3.2.1. Amendements ..... 49
  - 3.2.2. Association des plantes avec des champignons ..... 51
    - 3.2.2.1. Les champignons s'associant avec les racines des plantes ..... 53
      - 3.2.2.1.1. Les champignons endophytes..... 53
      - 3.2.2.1.2. La symbiose mycorhizienne ..... 53
    - 3.2.2.2. Apport des champignons mycorhiziens ou endophytes à la phytostabilisation ..... 61
  - 3.2.3. Association des plantes avec des bactéries..... 65

<b>4. Mécanismes de résistance et tolérance des champignons aux ETM.....</b>	<b>70</b>
4.1. Précipitation extracellulaire des ETM .....	71
4.2. Fixation des ETM à la paroi fongique .....	73
4.3. Absorption cellulaire des ETM .....	75
4.4. Complexation intracellulaire des ETM .....	77
4.5. Séquestration dans les organites intracellulaires.....	81
4.6. Autres mécanismes de tolérance .....	83
4.7. Mécanismes de tolérance et résistance et phytostabilisation .....	83
<b>Objectifs .....</b>	<b>87</b>
<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>93</b>
<b>1. Les sites d'études .....</b>	<b>95</b>
1.1. Le site de Pierrelaye-Bessancourt .....	95
1.2. Le site de Fresnes-sur-Escaut .....	97
1.3. Le site de Tavaux .....	99
1.4. Les sites de Micheville.....	101
1.5. Le site de Metaleurop .....	103
<b>2. Matériels biologiques .....</b>	<b>105</b>
2.1. Matériel végétal .....	105
2.1.1. Peupliers des dispositifs expérimentaux du projet PHYTOPOP .....	105
2.1.2. Peupliers et aulnes des sites expérimentaux du projet BIOFILTREE .....	107
2.1.3. Espèces ligneuses utilisées en conditions contrôlées au laboratoire .....	111
2.2. Micro-organismes utilisés .....	111
2.2.1. Souche bactérienne d' <i>Escherichia coli</i> .....	111
2.2.2. Souches de levures <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	111
2.2.3. Souche de <i>Laccaria bicolor</i> .....	113
2.2.4. Autres souches de champignons ectomycorhiziens ou endophytes conservées au laboratoire .....	113
2.3. Plasmides utilisés .....	113
2.3.1. Plasmides de clonage .....	113
2.3.1.1. Plasmide pGEM <sup>®</sup> -T.....	113
2.3.1.2. Plasmide pGEM <sup>®</sup> -T easy.....	115
2.3.2. Plasmides navette <i>E. coli</i> – <i>S. cerevisiae</i> .....	115
2.3.2.1. Plasmide pFL61 .....	115
2.3.2.2. Plasmide pYES2-GFP.....	115
<b>3. Méthodes .....</b>	<b>119</b>
3.1. Quantification du taux de mycorhization.....	119
3.2. Isolement de souches fongiques ectomycorhiziennes.....	119
3.2.1. A partir de carpophores.....	119
3.2.2. A partir de racines d'espèces ligneuses.....	121
3.3. Tests de tolérance des souches fongiques aux éléments traces métalliques .....	121
3.4. Tests de mycorhization en milieu contrôlé .....	121
3.4.1. Tests de mycorhization en boîtes de Pétri .....	121
3.4.2. Tests de mycorhization en pots.....	123
3.5. Techniques d'analyse du sol et de dosage des éléments minéraux.....	125
3.5.1. Prélèvements de sol .....	125
3.5.2. Détermination de la fraction biodisponible en éléments minéraux du sol .....	125
3.5.2.1. Extraction par le DTPA (acide Diéthylène Triamine Penta Acétique).....	125
3.5.2.2. Extraction par le NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (nitrate d'ammonium).....	127
3.5.2.3. Extraction par le Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (nitrate de calcium).....	127
3.5.3. Analyse des teneurs en éléments minéraux dans les tissus végétaux, fongiques et le sol par ICP-AES ( <i>Inductively-Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry</i> ).....	127
3.5.4. Détermination du pH du sol .....	129
3.6. Techniques d'extraction et d'analyses des acides nucléiques .....	129
3.6.1. Techniques d'extraction des acides nucléiques .....	129

3.6.1.1.	Extraction d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i> .....	129
3.6.1.2.	Extraction d'ADN génomique.....	131
3.6.1.3.	Extraction d'ARN totaux.....	131
3.6.2.	Séparation d'ADN ou d'ARN par électrophorèse en gel d'agarose .....	133
3.6.3.	Purification d'ADN .....	133
3.6.4.	Transcription reverse.....	133
3.6.5.	Amplification de l'ADN par PCR.....	135
3.6.5.1.	Les amorces nucléotidiques .....	135
3.6.5.2.	Composition d'un mélange réactionnel de PCR.....	137
3.6.5.3.	Différentes enzymes Taq ADN polymérases utilisées et leurs applications.....	137
3.6.5.3.1.	Mesure du taux de transcrits par RT-PCR .....	137
3.6.5.3.2.	PCR haute-fidélité .....	139
3.6.5.3.3.	PCR sur colonies.....	141
3.6.5.3.4.	Identification moléculaire de micro-organismes par amplification des régions ITS..	141
3.6.6.	Séquençage de l'ADN .....	143
3.6.7.	Analyses de séquences à l'aide d'outils de bioinformatique.....	143
3.7.	Techniques de clonage .....	145
3.7.1.	Préparation du vecteur.....	145
3.7.2.	Préparation du fragment à cloner .....	147
3.7.3.	Ligation .....	147
3.7.4.	Transformation des bactéries.....	147
3.7.4.1.	Préparation de bactéries thermocompétentes.....	147
3.7.4.2.	Transformation des bactéries par choc thermique.....	149
3.8.	Expression hétérologue dans la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	149
3.8.1.	Transformation de <i>S. cerevisiae</i> .....	149
3.8.2.	Complémentation fonctionnelle .....	151
3.8.2.1.	Test en gouttes.....	151
3.8.2.2.	Suivi de la croissance en milieu liquide .....	151
3.8.2.3.	Quantification du <i>pool</i> de métaux intracellulaires par ICP-AES .....	153
3.8.3.	Localisation cellulaire de protéines par fusion GFP ( <i>Green Fluorescent Protein</i> ).....	153
3.9.	Analyses statistiques .....	155

## **Résultats et discussions.....157**

### **1. Identification des communautés fongiques mycorrhiziennes du peuplier sur un sol pollué par des ETM .....159**

1.1.	Quantification du taux de mycorhization.....	159
1.2.	Identification moléculaire des champignons associés aux racines des peupliers .....	161
1.3.	Discussion.....	165

### **2. Sélection de souches fongiques performantes dans la séquestration des éléments traces métalliques .....177**

2.1.	Isolement de souches fongiques ectomycorhiziennes.....	177
2.2.	Caractérisation morphologique et moléculaire des souches fongiques isolées .....	183
2.2.1.	Caractérisation morphologique.....	183
2.2.2.	Caractérisation moléculaire.....	185
2.3.	Détermination du milieu optimum de croissance.....	187
2.4.	Test de tolérance aux ETM des différentes souches fongiques isolées .....	191
2.4.1.	Test de tolérance de plusieurs souches de <i>Paxillus involutus</i> aux éléments traces métalliques .....	191
2.4.2.	Test de tolérance aux ETM de diverses souches isolées des sites expérimentaux de Pierrelaye et Metaleurop .....	193
2.4.3.	Test de tolérance aux ETM de diverses souches appartenant au genre <i>Hebeloma</i> .....	195
2.4.4.	Discussion .....	197
2.5.	Test des souches fongiques d'intérêt en conditions contrôlées .....	207
2.5.1.	Test en pots .....	207
2.5.2.	Test des capacités de mycorhization des souches en boîte de Pétri.....	211



2.6.	Etude du potentiel de phytostabilisation de souches fongiques mycorhiziennes sur le terrain ..	215
2.6.1.	Mise en place de parcelles expérimentales.....	215
2.6.2.	Test des souches implantées en conditions contrôlées .....	217
2.6.3.	Discussion .....	219
<b>3.</b>	<b>Homéostasie métallique chez le champignon ectomycorhizien <i>Laccaria bicolor</i> .....</b>	<b>229</b>
3.1.	Détermination de la concentration inhibitrice à 50 % (IC50) de divers ETM chez <i>Laccaria bicolor</i> ....	229
3.2.	Capacité d'accumulation du zinc par <i>Laccaria bicolor</i> .....	231
3.3.	Les protéines LbZIPs .....	233
3.3.1.	Etude phylogénétique et analyse des séquences des transporteurs .....	233
3.3.1.1.	Sous-famille I : localisation putative à la membrane plasmique.....	235
3.3.1.2.	Sous-famille II : localisation putative à la membrane du réticulum endoplasmique .....	235
3.3.1.3.	Sous-famille III : localisation putative à la membrane de l'appareil de Golgi .....	235
3.3.1.4.	Sous-famille IV : localisation putative à la membrane vacuolaire.....	237
3.3.1.5.	Etude de la structure des gènes LbZips .....	237
3.3.1.6.	Etude de la topologie des protéines LbZIPs .....	239
3.3.2.	Etude du niveau d'expression des gènes par RT-PCR semi-quantitative .....	239
3.3.3.	Localisation subcellulaire des protéines de la famille LbZIP .....	243
3.3.3.1.	Localisation cellulaire des protéines LbZIPA et LbZIPB .....	243
3.3.3.2.	Localisation cellulaire de LbZIPC .....	245
3.3.3.3.	Localisation cellulaire de LbZIPD .....	245
3.3.4.	Complémentation fonctionnelle en système hétérologue, la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	247
3.3.4.1.	Complémentation de levures déficientes en absorption de divers ETM .....	247
3.3.4.1.1.	Complémentation de la levure déficiente en absorption du zinc : Zrt1-Zrt2Δ .....	247
3.3.4.1.2.	Complémentation de la levure déficiente en absorption de fer : Fet3-Fet4Δ .....	251
3.3.4.1.3.	Complémentation de la levure déficiente en absorption du cuivre : Ctr1Δ .....	251
3.3.4.2.	Surexpression des gènes LbZips chez la levure sauvage en présence de divers ETM .....	253
3.3.4.3.	Complémentation de la souche de levure mutante Zrt3Δ, incapable de remobiliser le zinc stocké dans la vacuole .....	253
3.3.5.	Discussion .....	255
3.4.	Les protéines CDF .....	269
3.4.1.	Etude phylogénétique et analyse des séquences des transporteurs .....	269
3.4.1.1.	Sous-famille I : transporteurs putatifs de zinc.....	269
3.4.1.2.	Sous-famille II : transporteurs putatifs de manganèse .....	271
3.4.1.3.	Sous-famille III : transporteurs putatifs de fer et de zinc .....	273
3.4.1.4.	Sous-famille IV : transporteurs proches de ScZRG17 .....	273
3.4.1.5.	Etude de la structure des gènes LbCdfs étudiés .....	273
3.4.1.6.	Etude de la topologie des protéines LbCDFs étudiées .....	273
3.4.2.	Etude de l'expression des gènes par RT-PCR semi-quantitative .....	275
3.4.3.	Localisation subcellulaire des protéines LbCDFA, B et C .....	277
3.4.4.	Complémentation fonctionnelle en système hétérologue.....	277
3.4.5.	Discussion .....	277
	<b>Conclusions générales et perspectives .....</b>	<b>285</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>305</b>