



**HAL**  
open science

# Influence des molécules antioxydantes produites par des plantes sur l'évolution physico-chimique et microbiologique de l'argilite du Callovo-Oxfordien

Dimitri Ubersfeld

► **To cite this version:**

Dimitri Ubersfeld. Influence des molécules antioxydantes produites par des plantes sur l'évolution physico-chimique et microbiologique de l'argilite du Callovo-Oxfordien. Science des sols. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0193 . tel-01527910

**HAL Id: tel-01527910**

**<https://theses.hal.science/tel-01527910>**

Submitted on 26 May 2017

**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.



## 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>

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

*ÉCOLE DOCTORALE « Ressources Procédés Produits Environnement »*

*Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux*

# THÈSE

Présentée et soutenue publiquement en vue de l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université de Lorraine**

**Spécialité Géosciences**

**par**

**Dimitri UBERSFELD**

**Soutenue le 13 Octobre 2016**

**Influence des molécules antioxydantes produites par  
des plantes sur l'évolution physico-chimique et  
microbiologique de l'argilite du Callovo-Oxfordien**

**Composition du jury :**

<b>Jean MARTINS</b>	Directeur de Recherche, HDR, LTHE Grenoble	Rapporteur
<b>Pierre RENAULT</b>	Directeur de Recherche, HDR, INRA-UAPV Avignon	Rapporteur
<b>Camille DUMAT</b>	Professeur HDR, INP-ENSAT Toulouse	Examinatrice
<b>Thierry LEBEAU</b>	Professeur HDR, LPGN Nantes	Examineur
<b>Corinne LEYVAL</b>	Directeur de Recherche, HDR, LIEC Nancy	Co-directrice
<b>Christian MUSTIN</b>	Directeur de Recherche, HDR, LIEC Nancy	Directeur
<b>Paul-Olivier REDON</b>	Ingénieur R&D, ANDRA	Invité



## Remerciements

En premier lieu, je remercie les membres du jury, Jean MARTINS, Directeur de recherche au LTHE de Grenoble, Pierre RENAULT, Directeur de recherche à l'INRA-UAPV d'Avignon pour avoir accepté de juger ce travail. Je remercie également Camille DUMAT, Professeur à l'INP-ENSAT de Toulouse et Thierry LEBEAU, Professeur au LPGN de Nantes, examinateurs de ce travail.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, et directeurs adjoints successifs du LIEC, Corinne LEYVAL et Christian MUSTIN de m'avoir proposé ce sujet de thèse. Merci pour vos conseils avisés et pour nos nombreux moments d'échanges tout au long de cette thèse. Je tiens à leur exprimer ma reconnaissance pour m'avoir guidé durant ce long parcours et pour leur confiance.

Je tiens à remercier Paul-Olivier REDON, Ingénieur R&D à l'Andra, qui a été présent dès ma première année de thèse, et m'a accompagné et aidé pour les sorties terrain à Bure.

Je tiens également à adresser mes remerciements à Fabien THOMAS, directeur du LIEC, pour son accueil au sein de cette unité du LIEC site-Aiguillette.

Un grand merci à toute l'équipe qui m'a aidé à de nombreuses reprises et ont tous contribué au bon déroulement de ma thèse : Thierry (Titi !), Christine (Christyne !), Cécile, David, Géraldine, Hervé, Jojo et Florence. Merci à tous les permanents du LIEC : Aurélie, Anne, Damien, Coralie, Sylvie, Laurence et Pierre. Un grand merci à mes deux compères de bureau, Patrick, et particulièrement Asfaw, pour tout ce temps passé ensemble ! Merci également à Caroline François, secrétaire générale du LIEC durant ma thèse, avec qui j'ai partagé mon bureau durant un long moment !

Merci à tous les doctorants, post-doctorants, stagiaires ou non-permanents pour toutes ces belles rencontres ! Amélia, Aurélie, Cécile, Charlotte, Damien, Romain, Djihad, Fabrice, Fadi, Florent, François, Marie, Marina, Marine, Florian, Nicolas, Yoann, Guillaume ! Merci à Quentin, compère de bureau le temps de quelques mois ! Merci à Johanne, binôme de bureau ! Merci à mes précieux amis, Frédéric, Ryad, Cédric, Pierre, Robin, Marie, Hermine et tous ceux avec qui j'ai tissés de nombreux liens durant cette thèse !

Je tiens à remercier mes parents, frères, grands-parents, oncles, tantes, cousin(e)s ainsi que ma belle-famille pour avoir toujours été présents, et ce, malgré la distance géographique de ces derniers mois ! Une pensée particulière pour mes parents, pour m'avoir soutenu durant toutes ces années d'études m'ayant menées jusqu'au doctorat. Merci à mon père pour m'avoir transmis la passion de la science (et du monde marin !) et pour m'avoir soutenu et

accompagné dans les moments les plus heureux comme les plus tristes. Une pensée émue pour ma mère, malheureusement disparue durant ma thèse, qui m'a encouragé et accompagné toutes ces années, soutenue dans chacun de mes choix, et qui était tellement fière du travail que je faisais dans cette thèse...

Mes dernières pensées se tournent vers ma petite famille, mon épouse, Joan, et notre fils Simon. Mon amour, merci pour m'avoir encouragé, aidé, réconforté et aimé durant toutes ces années depuis notre stage de Master 2 ! Je n'aurais pas pu accomplir un tel travail sans toi dans ma vie ! Tu m'as donné un magnifique fils et avons construit une magnifique famille ensemble ! Simon, ma petite crapule, merci pour ta joie de vivre au quotidien, ta bonne humeur et le bonheur que tu m'as apporté ! Un énorme merci à vous deux pour votre présence quotidienne toutes ces années !







## Sommaire

<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>3</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>8</b>
<b>Valorisations scientifiques .....</b>	<b>11</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>13</b>
<b>Chapitre I. État de l'art – Synthèse bibliographique.....</b>	<b>19</b>
<b>1 Processus d'altération biogéochimiques des phases minérales dans les sols .....</b>	<b>22</b>
1.1 <i>Acidification et altération minérale .....</i>	23
1.2 <i>Influence des ligands organiques sur la dissolution minérale .....</i>	25
1.3 <i>Altération par oxydo-réduction.....</i>	27
<b>2 Processus biogéochimiques induits par les associations plante-microorganismes :.....</b>	<b>28</b>
2.1 <i>Influence des plantes et de la rhizosphère .....</i>	28
2.2 <i>Les activités microbiennes rhizosphériques.....</i>	29
<b>3 Formation et réactivité de l'argilite du Callovo-Oxfordien.....</b>	<b>30</b>
3.1 <i>Formation et composition .....</i>	30
3.2 <i>Processus d'oxydation des sulfures .....</i>	32
3.3 <i>Altération des carbonates .....</i>	37
3.4 <i>Altération des argiles.....</i>	38
<b>4 La phytoremédiation .....</b>	<b>39</b>
4.1 <i>Principes et mécanismes de phytoremédiation .....</i>	40
4.2 <i>Application à la phytostabilisation des versées .....</i>	42
<b>5 Objectifs de la thèse.....</b>	<b>45</b>

<b>Chapitre II.</b>	<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>49</b>
<b>1</b>	<b>Argilite.....</b>	<b>51</b>
1.1	<i>Composition de l'argilite .....</i>	<i>51</i>
1.2	<i>Fractionnement granulométrique de l'argilite.....</i>	<i>52</i>
1.3	<i>Classification granulométrique.....</i>	<i>54</i>
1.4	<i>Enrichissement artificiel de l'argilite en sulfures (pyrite) .....</i>	<i>55</i>
<b>2</b>	<b>Extraction et production de l'inoculum bactérien .....</b>	<b>56</b>
<b>3</b>	<b>Plantes utilisées .....</b>	<b>57</b>
<b>4</b>	<b>Antioxydants employés .....</b>	<b>57</b>
4.1	<i>Linalol.....</i>	<i>57</i>
4.2	<i>Thymol .....</i>	<i>58</i>
4.3	<i>Carvacrol.....</i>	<i>58</i>
<b>5</b>	<b>Les solutions d'exsudats racinaires synthétiques .....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>Expériences en microcosme.....</b>	<b>59</b>
6.1	<i>Dispositifs de germination (composition et préparation) .....</i>	<i>59</i>
6.2	<i>Dispositif en colonnes « filtrantes ».....</i>	<i>60</i>
<b>7</b>	<b>Essais de végétalisation <i>in situ</i> .....</b>	<b>62</b>
7.1	<i>Contraintes climatiques .....</i>	<i>62</i>
7.2	<i>Contraintes édaphiques.....</i>	<i>62</i>
7.3	<i>Mise en place de l'essai de végétalisation .....</i>	<i>63</i>
7.4	<i>Mise en place d'une verse végétalisée .....</i>	<i>64</i>
7.5	<i>Échantillonnage dans les essais <i>in situ</i> .....</i>	<i>66</i>
<b>8</b>	<b>Analyses biologiques .....</b>	<b>66</b>
8.1	<i>Détection et numération des microorganismes.....</i>	<i>66</i>
8.2	<i>Estimation des paramètres mycorhiziens des racines de lavandins.....</i>	<i>68</i>
8.3	<i>Croissance et physiologie des plantes.....</i>	<i>69</i>
<b>9</b>	<b>Détection et dosage semi-quantitatif des antioxydants .....</b>	<b>70</b>
<b>10</b>	<b>Analyses physico-chimiques des lixiviats .....</b>	<b>71</b>
10.1	<i>Analyse élémentaire par ICP .....</i>	<i>71</i>
10.2	<i>Quantification des anions par chromatographie ionique .....</i>	<i>72</i>
<b>11</b>	<b>Analyses physico-chimiques des substrats solides .....</b>	<b>72</b>
11.1	<i>Spectrométrie Infrarouge (FTIR).....</i>	<i>72</i>
11.2	<i>Diffraction de rayons X (DRX) .....</i>	<i>73</i>
11.3	<i>Tomographie X.....</i>	<i>73</i>
<b>12</b>	<b>Traitements statistiques et analyses des données .....</b>	<b>75</b>

**Chapitre III. Molécules antioxydantes et plantes sélectionnées ..... 77**

**1 Les plantes endémiques des versées..... 79**

**2 Molécules antioxydantes..... 83**

2.1	<i>Les molécules antioxydantes d'intérêt</i> .....	83
2.2	<i>Le camphre</i> .....	84
2.3	<i>Le carvacrol</i> .....	85
2.4	<i>L'eucalyptol</i> .....	85
2.5	<i>L'eugénol</i> .....	85
2.6	<i>Le linalol</i> .....	85
2.7	<i>Le thymol</i> .....	86
2.8	<i>Les terpinènes</i> .....	86

**3 Plantes produisant des antioxydants ..... 88**

3.1	<i>Les familles botaniques d'intérêt</i> .....	88
3.2	<i>Composés antiseptiques et antioxydants produits par les familles d'intérêt</i> .....	93

**4 Développement des plantes d'intérêt sur l'argilite ..... 97**

**5 Conclusion .....102**

**Chapitre IV. Évolution physico-chimique et microbiologique de l'argilite en présence de composés aromatiques antioxydants d'origine végétale .....105**

**1 Impact des composés antioxydants sur la lixiviation des éléments du COx.....109**

**Antioxydant plant metabolites affect mineral element leaching from Callovo-Oxfordian clays .....109**

1.1	<i>Introduction</i> .....	109
1.2	<i>Materials and Methods</i> .....	111
1.3	<i>Results</i> .....	114
1.4	<i>Discussion</i> .....	121
1.5	<i>Conclusion</i> .....	125

**2 Effets des antioxydants et des exsudats racinaires de plante sur la dissolution minérale du COx .....127**

**Effects of plant antioxidants and root exudates on mineral dissolution of Callovo-Oxfordian clay substrate .....127**

2.1	<i>Introduction</i> .....	127
2.2	<i>Materials and Methods</i> .....	129
2.3	<i>Results</i> .....	132
2.4	<i>Discussion</i> .....	141
2.5	<i>Conclusion</i> .....	145

<b>Chapitre V.</b>	<b>Essais <i>in situ</i> – Végétalisation d’une verse d’argilite âgée par la lavande et le lavandin .....</b>	<b>147</b>
<b>1</b>	<b>Essais préliminaires de végétalisation par la lavande et le lavandin .....</b>	<b>151</b>
1.1	<i>Introduction</i> .....	151
1.2	<i>Matériels et Méthodes</i> .....	151
1.3	<i>Résultats</i> .....	152
1.4	<i>Discussion</i> .....	158
1.5	<i>Conclusions</i> .....	161
<b>2</b>	<b>Suivi d’une verse végétalisée par le lavandin.....</b>	<b>162</b>
	<b>Phytostabilization of a Callovo-Oxfordian clay heap using <i>Lavandula x intermedia</i>.....</b>	<b>162</b>
2.1	<i>Introduction</i> .....	162
2.2	<i>Materials and Methods</i> .....	164
2.3	<i>Results</i> .....	166
2.4	<i>Discussion</i> .....	171
2.5	<i>Conclusion</i> .....	174
<b>Chapitre VI.</b>	<b>Discussion générale – Perspectives et conclusions .....</b>	<b>175</b>
<b>1</b>	<b>Effet des composés antioxydants sur l’altération de l’argilite .....</b>	<b>178</b>
<b>2</b>	<b>Impact de la végétalisation sur les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques du COx .....</b>	<b>181</b>
<b>3</b>	<b>Choix des plantes pour la phytostabilisation des verses de COx .....</b>	<b>183</b>
<b>4</b>	<b>Perspectives.....</b>	<b>185</b>
<b>5</b>	<b>Conclusion générale .....</b>	<b>187</b>
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>189</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>207</b>

## Liste des abréviations

<b>ABTS</b> : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid	<b>LIEC</b> : Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux
<b>ADNr</b> : acide désoxyribonucléique ribosomique	<b>MO</b> : Matière Organique
<b>Andra</b> : Agence nationale pour la gestion des déchets radioactifs	<b>MPN</b> : Most Probable Number
<b>ARE</b> : Artificial root exudates	<b>MS</b> : Mass Spectrometer
<b>BSA</b> : Bovine Serum Albumin	<b>NBT</b> : Nitro Blue Tetrazolium
<b>Cigéo</b> : Centre industriel de stockage géologique	<b>NPP</b> : Nombre le Plus Probable
<b>CMHM</b> : Centre de Meuse/Haute-Marne	<b>OTELo</b> : Observatoire Terre et Environnement de Lorraine
<b>COx</b> : Argilite du Callovo-Oxfordien	<b>PCR</b> : Polymerase Chain Reaction
<b>DGGE</b> : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	<b>PDMS</b> : Polydiméthylsiloxane
<b>DMSO</b> : Dimethyl sulfoxide	<b>PET</b> : Polytéréphtalate d'éthylène
<b>DPPH</b> : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	<b>RP2E</b> : Ressources Procédés Produits Environnement
<b>DRX</b> : Diffraction des Rayons X	<b>SPME</b> : Solid phase microextraction
<b>EPS</b> : Exopolysaccharides	<b>SYBR® green</b> : SYnergy BRands green $C_{32}H_{37}N_4S$
<b>FTIR</b> : Fourier Transform InfraRed spectroscopy	<b>TEAC</b> : Trolox equivalent antioxidant capacity
<b>GSH</b> : Glutathion SH	<b>TTGE</b> : Temporal temperature Gel Electrophoresis
<b>GST</b> : Glutathion S-Transférase	<b>UL</b> : Université de Lorraine
<b>ICP-AES</b> : Inductively Coupled Plasma-atomic emission spectrometry	<b>URL</b> : Underground Research Laboratory



## Liste des figures

Figure 1 : Photographie de la surface d'une verse âgée (Bure, 26/10/2012).....	34
Figure 2 : Schéma des processus de l'altération de l'argilite par oxydation des pyrites.....	37
Figure 3 : Principaux mécanismes de phytoremédiation.....	40
Figure 4 : Altération physico-chimique et microbiologique de l'argilite par les interactions plantes-microorganismes.....	43
Figure 5 : Hypothèse sur les processus de stabilisation de l'altération géochimique et microbiologique de l'argilite du Callovo-Oxfordien par des plantes.....	44
Figure 6 : Schéma de synthèse de stabilisation des interactions argilite-plante-microflore après excavation.....	47
Figure 7 : Protocole de séparation granulométrique par voie humide.....	53
Figure 8 : Étape de cyclonage : séparation des éléments plongeants et flottants par cyclonage.....	54
Figure 9 : Pyrites framboïdales isolées de la fraction 280-1000 µm de COx pré-broyé à 3 mm et ayant subi une séparation granulométrique par voie humide et sèche.....	55
Figure 10 : Structure moléculaire du linalol.....	58
Figure 11 : Structure moléculaire du thymol.....	58
Figure 12 : Structure moléculaire du carvacrol.....	59
Figure 13 : Graines de <i>Lavandula angustifolia</i> avant traitement (a) et durant le traitement à l'acide gibbérellique à 300 mg.l <sup>-1</sup> (b).....	60
Figure 14 : Dispositifs en colonnes « filtrantes » de l'expérimentation avec antioxydants (a) et avec composés foliaires et racinaires (b) en conditions contrôlées.....	62
Figure 15 : Dispositif d'essai de végétalisation de lavande sur verse âgée à l'Est (à gauche) et au Sud avec accès protégé et une allée recouverte de caillebotis escamotables (à droite) 62 jours après plantation.....	63
Figure 16 : Modalités de préparation et de plantation des lavandes et lavandins implantés sur verse âgée à l'Est et au Sud.....	64
Figure 17 : Schéma (a) et dispositif (b) <i>in situ</i> de végétalisation sur verse âgée et témoin non planté, au Sud, avec dispositif de récupération des eaux de ruissellement en bas de pente.....	65

Figure 18 : Schéma de prélèvements de l'essai de végétalisation des verses en surface (P1), à 5 cm de profondeur (P2), à 15 cm de profondeur (P3) et à 30 cm de profondeur (P4) .....	66
Figure 19 : Dispositif de la micro-extraction sur phase solide en place avec un échantillon foliaire de lavandin (à droite) .....	71
Figure 20 : Microcosme de lavande dans le microtomographe X – Tomographie X d'un détail .....	75
Figure 21 : Photographies de la végétation « endémique » de la verse âgée (26.10.12) ; <i>Tussilago farfara</i> (a) ; <i>Cirsium vulgare</i> et <i>Picris hieracioides</i> (b).....	80
Figure 22 : Culture de thym ( <i>Thymus serpyllum</i> ) à gauche et de luzerne ( <i>Medicago sativa</i> ) à droite sur de l'argilite fraîche (en bas) et âgée (en haut) 5 jours après germination en chambre de culture.....	98
Figure 23 : Observation et reconstruction en tomographie X.de racines de luzerne au sein de l'argilite 26 jours après germination .....	98
Figure 24 : <i>Lavandula angustifolia</i> vernalisée sur COx âgé (à gauche) et prétraitées avec 200 mg.l <sup>-1</sup> d'acide gibbérellique sur COx frais et âgé (à droite) à 14 jours et 9 jours après semis respectivement .....	99
Figure 25 : Graines de <i>Lavandula angustifolia</i> vernalisées et imbibées pendant 24h avec de l'eau osmosée (à droite), 100 mg.l <sup>-1</sup> d'acide gibbérellique (au milieu), 300 mg.l <sup>-1</sup> d'acide gibbérellique (à gauche) 7 jours après semis.....	99
Figure 26 : Section longitudinale par tomographie X d'un pot d'argilite planté - Lavande germée et cultivée pendant 145 jours sur COx frais .....	101
Figure 27 : Représentation tomographique en trois dimensions de l'évolution des racines d'une lavande cultivée pendant 145 jours sur le COx frais: Orange: éléments pyriteux; Bleu: racines et bulles d'air.....	101
Figure 28 : Cumulated quantities of water absorbed by COx (ml) amended with linalool, thymol or carvacrol at three different concentrations (2, 40, and 80 mg.l <sup>-1</sup> ) and non-amended (control) for 57 days.. .....	115
Figure 29 : Evolution of pH values in leachates over time, with COx amended with linalool (l), thymol (T), or carvacrol (C) at three different concentrations (2, 40, and 80 mg.l <sup>-1</sup> ) and non-amended (control).....	116
Figure 30 : Cumulative quantities of SO <sub>4</sub> (μmol.g <sup>-1</sup> COx) based on cumulated volumes (ml). Blue circles, experimental data; continuous lines, first-order kinetic model curves for thymol at 2 mg.l <sup>-1</sup> and control (n=1).....	116



Figure 31 : Leaching rate K ( $\mu\text{mol.ml}^{-1}$ ) of chloride, nitrate, sulphate, and phosphate in COx amended with the three antioxidants (linalool, thymol and carvacrol) at three concentrations (2, 40, and 80 $\text{mg.l}^{-1}$ ), and non-amended (control), calculated for S2.....	118
Figure 32 : Maximum leachate concentrations ( $Q_{\text{max}}$ , $\mu\text{mol.g}^{-1}$ COx) for chloride and nitrate (a), sulphate and phosphate (b) in COx amended with the three antioxidants (linalool, thymol, and carvacrol) at three concentrations (2, 40 and 80 $\text{mg.l}^{-1}$ ), and non-amended (control), calculated for S2. ....	119
Figure 33 : Transmission IR spectra of (a) raw ground sample, (b) H <sub>2</sub> O-treated Cox sample and (c) carvacrol-treated sample (80 $\text{mg.l}^{-1}$ ). Inset shows an enlargement of $\nu\text{C-H}$ region ( $2800\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ ) of the water (b) and carvacrol (c) treated sample spectrum. ....	121
Figure 34 : Leachate pH changes over time with COx, amended with,; artificial root exudates and bacteria (EB); artificial root exudates and bacteria, and pyrite (EBP); with pyrite (P) and non-amended control (C) and with thymol (0; 0.2; 2 and 20 $\text{mg.l}^{-1}$ ). ....	133
Figure 35 : Leaching rate ( $\mu\text{mol.ml}^{-1}$ ) for arsenic (As), calcium (Ca), potassium (K), magnesium (Mg), sodium (Na), strontium (Sr) for the COx amended with: artificial root exudates and bacteria (EB); artificial root exudates and bacteria, and pyrite (EBP); pyrite (P) and non-amended control (C). and with thymol (0; 0.2; 2 and 20 $\text{mg.l}^{-1}$ ).....	135
Figure 36 : Leaching rate ( $\mu\text{mol.ml}^{-1}$ ) for chlorine, nitrate, sulphate for the COx amended with: artificial root exudates and bacteria (EB); artificial root exudates and bacteria, and pyrite (EBP); pyrite (P) and non-amended control (C), and with thymol at four concentrations (0; 0.2; 2 and 20 $\text{mg.l}^{-1}$ ).....	136
Figure 37 : Bacterial and fungal abundance (16S and 18S rDNA gene copy number. $\text{g}^{-1}$ ) after 88 days in the COx leached with thymol at 0 $\text{mg.l}^{-1}$ or 20 $\text{mg.l}^{-1}$ amended with: artificial root exudates and bacteria (EB); artificial root exudates and bacteria, and pyrite (EBP); pyrite (P) and non-amended control (C).....	137
Figure 38 : Concentration profiles of short-chain organic acids in the COx leachates ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) after 1 day (upper graphs) and 88 days (lower graphs) of incubation. COx amended with: artificial root exudates and bacteria (EB); artificial root exudates and bacteria, and pyrite (EBP) and with thymol at four concentrations (0; 0.2; 2 and 20 $\text{mg.l}^{-1}$ ). ....	141

Figure 39 : Mesures des hauteurs et largeurs des lavandins plantés sur la verse âgée et exposés à l'Est (a,b) ou au Sud (c,d) au cours du temps. Planté-Terreau: boutures pré-cultivées sur terreau avec ajout de terreau lors de la plantation; Planté-COx: boutures pré-cultivées sur terreau dont les racines ont été rincées pour retirer le terreau avant la plantation. ....	154
Figure 40 : Biomasses sèche des parties aériennes et racinaires (a), rapport entre la biomasse sèche racinaire et aérienne (b), et pourcentage d'humidité (c) des lavandins plantés sur verse avec ou sans (racines rincées avant plantation) terreau et prélevés après 276 jours.....	155
Figure 41 : Quantités lixiviables à l'eau de chlorure (Cl <sup>-</sup> ), nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ), sulfates (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ), calcium (Ca), potassium (K), magnésium (Mg), sodium (Na), aluminium (Al), arsenic (As), strontium (Sr) en µmol.g <sup>-1</sup> d'argilite sèche prélevée à 276 jours en surface (P1- 2 cm) ou en profondeur (P3-30 cm) sur verse âgée végétalisée par des lavandins.....	156
Figure 42 : Nombre de copies de gènes bactériens (16S) et fongiques (18S) par gramme de COx sec prélevé sur la verse végétalisée par des lavandins pré- cultivés sur terreau avec les racines rincées avant plantation, ou témoin non plantée, prélevé en surface ou à 30 cm de profondeur après 276 jours.....	157
Figure 43 : Racines de lavandins pré-cultivés sur terreau, dont les racines ont été rincées avant plantation, prélevées 276 jours après plantation sur la verse âgée et montrant des arbuscules de champignons mycorhiziens. Elles ont été colorées au bleu trypan et observées sous microscope optique (grossissement x100).....	158
Figure 44 : Rainfall at Bure from July 1st 2014 to June 30th 2015 with daily rainfall (mm), (gray peaks), cumulated quantity of rainfall (mm) (dark line) and sampling dates (dark triangles). ....	167
Figure 45 : Quantities of leached cations and anions from planted (lavandin) and unplanted COx heap and in rainwater for 351 days. a) sodium (Na), arsenic (As), and strontium (Sr); b) chloride (Cl <sup>-</sup> ) and nitrate (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ); c) calcium (Ca), potassium (K); d) magnesium (Mg), sulphate (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ).....	168
Figure 46 : Water extractable concentrations (µmol.g <sup>-1</sup> COx) of a) chloride (Cl <sup>-</sup> ), nitrate (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ); b) sulphate (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ); c) calcium (Ca), potassium (K), magnesium (Mg), and sodium (Na) from surface (2 cm) or deep (15 cm depth) planted (lavandin) or unplanted COx at 351 days. ....	169

Figure 47 : Bacterial (16S rDNA) and fungal (18S rDNA) gene abundance (copy number g <sup>-1</sup> COx) at 2 cm (surface) or 15 cm depth (depth) planted (lavandin) or unplanted COx samples at 351 days..	170
Figure 48 : Essential oil compound relative percentage (%) extracted from lavandin leaves (a), roots (b), and flowers (c) at 351 days..	171
Figure 49 : Représentation des interactions entre le lavandin, les microorganismes et le COx	178

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition minéralogique (%) et teneur en matière organique ( $\text{g kg}^{-1}$ ) de l'argilite du Callovo-oxfordien (COx) (d'après Scholtus, 2003) .....	52
Tableau 2 : Composition élémentaire de l'argilite du COx (modifié d'après Scholtus, 2003; Belcourt, 2009).....	52
Tableau 3 : Bilan granulométrique de COx frais pré-broyé à 3 mm.....	54
Tableau 4 : Amorces, températures d'hybridation (TH), nombre de cycles (C) et tailles attendues des fragments (TF) de la PCR.....	67
Tableau 5 : Relevé floristique et caractéristiques écophysiologiques des plantes des verses âgées (en haut) et fraîche (en bas) (d'après Noyere, 2012). .....	82
Tableau 6 : Synthèse des travaux sur la stabilisation et la passivation électrochimique de l'oxydation des sulfures avec des molécules organiques et des oxyanions (d'après Sorrenti, 2007) .....	83
Tableau 7 : Caractéristiques physico-chimiques de composés antioxydants d'origine végétale .....	87
Tableau 8 : Critères de sélection de plantes d'intérêt dans un contexte de végétalisation de verses de COx (modifié d'après Bourgoïn et al., 1989)- Caractéristiques écophysiologiques requises.....	88
Tableau 9 : Caractéristiques écophysiologiques des plantes d'intérêt.....	95
Tableau 10 : Chemical composition and reactivity of COx, s) .....	112
Tableau 11 : Correlation coefficient ( $R^2$ ) and sum of squares of the deviation between modeled values and measured values of cumulated leached quantities of chloride (Cl), nitrate ( $\text{NO}_3$ ), sulphate ( $\text{SO}_4$ ), and phosphate ( $\text{PO}_4$ ) over time. ....	117
Tableau 12 : Percentages of sulphur and phosphorus (%) leached from COx after 57 days of incubation as compared to initial COx.....	120
Tableau 13 : Percentage of leached sulfur and phosphorus (%) from COx after 88 days of incubation compared to the initial COx. ....	138
Tableau 14 : Percentage of leached aluminium, calcium, iron, potassium, magnesium, sodium (%) of COx after 88 days of incubation compared to the initial COx. ....	139
Tableau 15 : Nombre de plants ayant survécu au cours du temps sur la verse âgée en fonction de l'espèce (lavande ou lavandin), du mode de pré-culture ou de plantation et de l'orientation.....	153

Tableau 16 : Paramètres de mycorhization des lavandins, plantés avec terreau ou avec racines rincées, sur la verse agée et prélevés après 276 jours de culture .....	158
--	-----



## Valorisations scientifiques

### Publications :

Ubersfeld, D., Leyval, C., Redon, P.-O., & Mustin, C. Antioxidant plant metabolites affect mineral element leaching from Callovo-Oxfordian clays. Soumise à *European Journal of Soil Science*

Ubersfeld, D., Leyval, C., Redon, P.-O., & Mustin, C. Effects of plant antioxidants and root exudates on mineral dissolution of Callovo-Oxfordian clay substrate. À soumettre

Ubersfeld, D., Mustin, C., Redon, P.-O., & Leyval, C., Phytostabilization of a Callovo-Oxfordian clay heap using *Lavandula x intermedia*. À soumettre

### Posters :

Ubersfeld, D., Leyval, C., Redon, P.-O., & Mustin, C. Regulation and stabilisation of physical, chemical and microbiological alteration processes by plant exudates and antioxidants in Callovo-Oxfordian argillite. Rhizosphere 4 Conference: "Stretching the Interface of Life". Maastricht 22-25 June 2015

Ubersfeld, D., Leyval, C., Redon, P.-O., & Mustin, C. Regulation and stabilisation of physical, chemical and microbiological alteration processes by plant exudates and antioxidants in Callovo-Oxfordian argillite. Environmental Specimen Banks; 2015, Andra

Ubersfeld, D., Leyval, C., Redon, P.-O., & Mustin, C. Regulation et stabilisation par des plantes des processus d'alteration physiques, chimiques et microbiens des argilites du callovo-oxfordien, Séminaire de l'Ecole Doctorale RP2E, 2014





## Introduction générale

---



Depuis 2005, après avoir conclu à la faisabilité du stockage profond de déchets radioactifs, l'Agence nationale pour la gestion des déchets radioactifs (Andra) a été missionnée pour la mise en place d'un Centre industriel de stockage en souche Géologique profonde (Cigéo) de déchets nucléaires à haute activité ou à vie longue (HA-VL). Le site d'exploitation choisi est situé dans la bordure orientale du Bassin de Paris, en limite des départements de Meuse/Haute-Marne. Un réseau de galeries et d'alvéoles de stockage sera déployé à une profondeur de -450 m dans une formation argileuse litée du Callovo-Oxfordien (COx), nommée argilite. Les propriétés géomécaniques et physico-chimiques de l'argilite du COx en font un matériau satisfaisant pour le confinement durable et en profondeur de déchets radioactifs. En effet, la compaction et la consolidation de cette couche sédimentaire à dominante argileuse, limitent fortement les circulations de fluides et d'ions.

Dans l'hypothèse actuelle d'une exploitation en 2025, plusieurs millions de mètres cubes de déblais d'argilite du Callovo-Oxfordien, seront excavés et stockés en surface suite aux percements des puits d'accès et des galeries. Ces dépôts entreposés en surface durant plusieurs dizaines d'années seront partiellement utilisés comme matériau de comblement des galeries après le remplissage des alvéoles. L'évolution des propriétés physico-chimiques, géomécaniques et microbiologiques des vers au fil des ans est donc une question cruciale. Quels seront les effets des conditions climatiques, de la colonisation par des microorganismes et éventuellement par des végétaux sur l'évolution de ces propriétés de l'argilite ? Par ailleurs, si la végétalisation des dépôts ou vers est envisagée, à la fois pour des questions paysagères et pour limiter les processus d'érosion, quel sera l'impact des plantes et d'une couverture végétale pérenne sur les transformations physiques et (bio)chimiques du matériau d'origine ?

Comme dans tout écosystème terrestre et dans les sols, l'altération météoritique des dépôts et les activités biologiques transformeront plus ou moins rapidement des éléments minéraux et organiques présents dans l'argilite. Les sources de carbone, d'énergie et de nutriments libérées par la dégradation des matières organiques autochtones ou allochtones (e.g. composés foliaires, exsudats, mucilage, ...), stimuleront les activités microbiennes, qui agiront directement ou indirectement sur les propriétés physico-chimiques des composés minéraux et organiques constitutifs de l'argilite.

Par ailleurs, la végétation utilisée pour stabiliser les vers et limiter leur érosion et leur altération chimique favorisera l'installation progressive d'interactions plante-microorganisme-argilite durables, au sein de ces substrats argileux, *a priori* peu fertiles.

Soutenue par le projet ECOSTAB (Fiche ANDRA-UL n°42), cette thèse avait pour objectifs d'identifier une végétation robuste capable de s'installer *in situ* et de stabiliser durablement les versets ainsi que d'étudier le rôle des plantes, en particulier celles produisant des molécules antioxydantes, sur les processus d'altération physico-chimique et microbiologique de l'argilite du COx. Pour répondre à cet objectif, les travaux entrepris se sont attachés à :

- Inventorier les familles et espèces de plantes produisant des composés antioxydants et pouvant croître sur les versets d'argilite,
- Étudier l'évolution physico-chimique et microbiologique de l'argilite en présence de composés organiques d'origine végétale,
- Évaluer l'impact d'une végétalisation d'une verset *in situ*.

Le premier chapitre présente une synthèse des connaissances sur les phénomènes d'altération biogéochimiques des sols au sein des interactions plante-sol-microorganismes. L'évolution biogéochimique de cette argilite, qui a fait l'objet d'études préalables, y est présentée. Le second chapitre présente les matériels sélectionnés ainsi que l'ensemble des techniques analytiques utilisées et des expérimentations réalisées durant ce travail. Le troisième chapitre porte sur la recherche de molécules antioxydantes et de plantes d'intérêt susceptibles de s'implanter durablement sur les versets. Le quatrième chapitre s'intéresse, à partir d'expériences menées au laboratoire, à l'évolution physico-chimique et microbiologique de l'argilite en présence de composés aromatiques antioxydants d'origine végétale. Dans un premier temps, une série d'expériences en colonnes au laboratoire a été réalisée, pour estimer l'évolution temporelle des caractéristiques physico-chimiques des lixivats d'argilite en présence ou non de composés antioxydants d'origine végétale. Dans un deuxième temps, l'effet « plante » sur les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des lixivats et du substrat argileux a été simulé par l'ajout concomitant de composés antioxydants et d'exsudats racinaires synthétiques. Le cinquième chapitre présente deux essais de végétalisation *in situ* par des lamiacées sur des parcelles d'une verset d'argilite âgé, avec un suivi quantitatif de l'évolution biogéochimique de l'argilite, de la qualité des eaux de ruissellement et du développement du couvert végétal. Dans un premier essai destiné à évaluer les contraintes climatiques et édaphiques, l'implantation et le développement durable de plants de lavande (*Lavandula angustifolia*) et lavandin (*Lavandula x intermedia* « *grosso* ») sur la verset a été testée et qualifiée. Dans une deuxième expérimentation, l'évolution géochimique et les processus d'altération sur des parcelles de verset densément

végétalisées avec du lavandin ou nues ont été suivies pendant presque un an. Enfin, le chapitre VI correspond à la synthèse et à la discussion des principaux résultats. Il propose un modèle phénoménologique d'interactions entre la plante-microorganisme-argilite et des processus d'altération associés. Il ouvre également de nouvelles perspectives de recherche afin d'améliorer la stabilisation chimique et physique des versets d'argilite déposées en surface en vue de réutilisation future.

Le chapitre IV fait l'objet d'une publication scientifique en re-soumission, d'une publication en préparation, et le chapitre V d'une publication en préparation. Ces trois parties sont ainsi rédigées en anglais.



## Chapitre I. État de l'art – Synthèse bibliographique

---





Dans le cadre de la végétalisation durable des versées à déblais d'argilite du Callovo-Oxfordien, nous devons considérer le matériel argileux comme un substratum extrême et peu fertile. Composé à plus de 90% de particules sub-micrométriques et à 50% de minéraux argileux (illite, smectite), ce matériau très plastique et peu perméable n'est pas favorable au développement spontané de strates herbacées ou arbustives; la végétation endémique clairsemée qui s'est installée progressivement depuis dix ans sur les versées d'argilites exposées à l'air libre en témoigne. Les conditions physico-chimiques et oligotrophiques rencontrées au sein de ces formations argileuses ne favorisent pas non plus une activité microbienne intense (Boivin-Jahns et al., 1996; Motamedi et al., 1996; West & Mckinley, 2003; Fukunaga et al., 2005; Fru & Athar, 2008). Toutefois, une fois exposé aux intempéries et aux conditions oxydantes de surface, il est envisageable que des microorganismes aérobies ou anaérobies hétérotrophes ou autotrophes puissent coloniser ce matériau, au moins en surface, et acquérir les ressources énergétiques et nutritionnelles essentielles à leur métabolisme. Cette colonisation, et l'activité microbienne, pourrait être ensuite renforcée par la mise en place d'un couvert végétal et de systèmes racinaires actifs susceptibles d'injecter dans le substratum des composés riches en carbone et azote dégradables ou assimilables par les microorganismes. Si certains travaux exploratoires ont montré que la végétalisation d'argilites avec des plantes fourragères adaptées aux terrains secs et superficiels, comme la fétuque ou le lotier, était possible (Scholtus, 2003), la dynamique des communautés microbiennes associées à ces plantes, en lien avec les processus d'altération des constituants minéraux et leur évolution au cours du temps, n'a jamais vraiment été abordée. De même, la végétalisation avec des plantes dont les exsudats racinaires ou les composés foliaires pourraient agir sur les processus d'oxydation ou d'altération des minéraux, en stimulant, sélectionnant ou inhibant des activités microbiennes n'a, à notre connaissance, pas été étudiée. Ainsi, dans le cadre de ce travail, la recherche et l'étude d'associations plante-microorganismes efficaces contre la détérioration des matériaux et compatibles avec les conditions oligotrophes imposées par les versées passent par un bilan des connaissances sur : (i) les mécanismes bio-induits d'altération des minéraux et les relations sol-plante-microorganismes, (ii) les caractéristiques de l'argilite et les processus qui conduisent à son altération, (iii) l'utilisation des plantes pour la végétalisation et la phytoremédiation. La capacité des plantes à produire des molécules antioxydantes sera abordée dans le chapitre III. Ce sont les principaux objectifs de ce chapitre.

## **1 Processus d'altération biogéochimiques des phases minérales dans les sols**

Il est admis que l'action de l'eau de pluie sur les roches affleurantes est un processus primordial de la formation des sols. L'apport d'eau de pluie, chargée en gaz carbonique, oxydants et aérosols organiques acides, engendre une décomposition chimique progressive des minéraux primaires de la roche mère formés, la plupart du temps, dans des conditions réductrices et basiques. Ces processus géochimiques changent la composition chimique des eaux et minéralogique des couches géologiques à l'affleurement sur lequel la végétation s'installe progressivement et durablement. Ces voies d'altération primaire des minéraux aboutissent à (i) la libération de cations qui détermine l'acidité des eaux naturelles, (ii) accroître la disponibilité d'éléments minéraux essentiels, jusque-là inaccessibles aux organismes vivants. Ces processus purement physico-chimiques sont rapidement relayés par des processus biologiques, utilisant les stocks primaires en éléments nutritifs ainsi constitués.

La dégradation des matières organiques, autochtones ou allochtones, par les plantes et des microorganismes du sol, conduit à la production et l'excrétion de métabolites acides ou complexants qui viennent renforcer les processus primordiaux de dissolution chimique des minéraux (Berthelin et al., 1994). Une fois les conditions édaphiques nécessaire atteintes, les systèmes racinaires des plantes pionnières fragmentent les roches et les grains minéraux, augmentant ainsi la réactivité des surfaces générées vis à vis de composés racinaires ou des métabolites sécrétés par les microorganismes associés ou non aux racines.

Quelle que soit leur origine, ces transformations biogéochimiques et fondamentales des minéraux des sols s'opèrent principalement par voie acide ou chélatante (e.g. protons, acides organiques, ...). C'est cette action conjointe et synergique des protons et des ligands organiques qui détermine les taux et vitesses de dissolution des minéraux. En se fixant sur les surfaces minérales, protons et ligands favorisent l'altération très locale des phases minérales. En complexant les éléments en solution, les chélatants déplacent les équilibres minéral/solution et accroissent la solubilité des éléments minéraux et leur dispersion dans la phase aqueuse.

Ainsi, dans tous les systèmes plantes-microorganismes-minéraux, même primordiaux, les principaux processus fondamentaux de la pédogenèse sont toujours présents, i.e. l'altération des roches et des minéraux, l'apport de matières organiques dégradables et la dispersion des éléments chimiques et des matières solubles dans les eaux interstitielles (Duchaufour, 1983). Il en sera de même dans les systèmes argilite-plante-microorganisme que nous étudions plus précisément dans ce travail.

### 1.1 Acidification et altération minérale

Les conditions physicochimiques du sol et notamment le pH et le  $E_H$  influencent fortement la solubilité des phases minérales primaires (silicates, sulfures...) ou néoformées (oxydes de fer, argiles, ...).

Inversement, les processus d'altération des minéraux modifient les réserves alcalines ou acides des sols en générant des solutions chargées en acides minéraux ( $H_2SO_4$ ,  $H_2CO_3$ ) ou bases minérales ( $HCO_3^-$ ). De même, toutes les activités métaboliques racinaires ou microbiennes et les processus biologiques de dégradation de sources de carbone ou d'azote sont à l'origine de la production d'acides carboxyliques (R-COOH) ou de bases azotées (R-NH<sub>2</sub>). En fonction des ratio C/N des matières organiques dégradées et de leur contenu plus ou moins riches en sucres ou protéines, ces activités biologiques augmentent ainsi l'acidité ou la basicité des sols en modifiant principalement la concentration en acide carbonique dans les sols (Robert & Berthelin, 1986; Barker et al., 1997; Barker & Banfield, 1998). Ainsi, la qualité et la disponibilité des matières organiques contrôlent en grande partie les processus d'altération minérale qui ont lieu par voie acide ( $H^+$ ) ou basique ( $OH^-$ ).

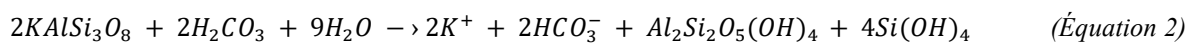
Communément dans les sols, le pH varie entre 4,5 et 8,5 en fonction : (i) des productions nettes de protons et de métabolites issus des racines des plantes et des activités microbiennes (ii) des différents processus de transformation du carbone et de l'azote (production de  $CO_2$ , nitrification, ammonification...) associés à la dégradation des matières (iii) de la présence de tampons minéraux (carbonates, alumino-silicates). Dans les cas extrêmes, en l'absence de tampons efficaces, l'oxydation de certains sols riches en soufre réduit (sulfures), conduit à une hypersalinisation (sulfates) accompagnée d'une acidification pouvant maintenir le pH dans des valeurs inférieures à 3 (Bloomfield & Coulter, 1974; Dent, 1980). Enfin, au-delà des facteurs naturels et des processus biochimiques, des facteurs anthropiques modifient aussi l'acidité des sols : la présence de résidus industriels soufrés ou phosphorés, l'apport d'amendements agricoles riches en bases potassiques ou calciques (chaulage), la végétalisation par des espèces herbacées ou des essences forestières (Colmer & Hinkle, 1947; Singer & Stumm, 1970).

Même si l'altération minérale par voie basique est possible, c'est en général l'altération par voie acide qui prédomine dans les horizons superficiels des surfaces continentales, principalement pour deux raisons : (1) les eaux de pluie et interstitielles des sols sont plus acides que celles des aquifères (2) l'oxydation des matières organiques par l'oxygène de l'air génère de l'acidité sous forme de gaz carbonique dissout ( $H_2CO_3$ ). Les conditions physico-

chimiques favorables aux altérations par voie basique des minéraux sont obtenues en profondeur ou dans des environnements confinés (Baize et al., 2009).

Dans les sols, la production de protons et d'acides minéraux favorise la dissolution des minéraux par l'attaque des sites de surface (groupes -OH principalement) ou par le remplacement de certains cations échangeables ou structuraux (K, Ca, Mg, Fe...). En particulier, les processus de dissolution par voie acides des minéraux silicatés consomment des protons, dont les flux nets servent à quantifier les cinétiques de dissolution (Bourrié & Lelong, 1994).

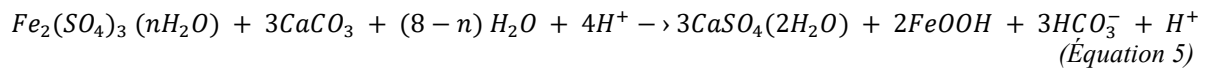
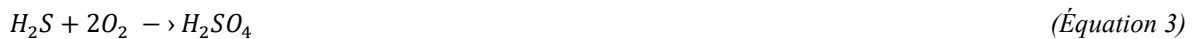
C'est le cas pour les minéraux silicatés basiques : comme les alumino-silicates (e.g. Orthose  $KAlSi_3O_8$ ) ou les silicates ferro-magnésiens de type olivines (e.g. Forsterite,  $Mg_2SiO_4$ ). L'action de l'acide carbonique sur ces minéraux libère des cations métalliques et des éléments essentiels (K, Mg) et produit une base faible composée d'hydrogénocarbonate (Eq. 1) (Giammar et al., 2005). Cette réaction de neutralisation acide-base libère aussi de la silice dissoute, sous la forme d'un acide très faible (acide ortho-silicique,  $Si(OH)_4^0$ ,  $pK_a = 9,8$ ) dont l'effet est négligeable au voisinage de la neutralité. En fonction des conditions thermodynamiques, des phases secondaires phyllosilicatées comme des minéraux argileux (illite,  $Al_2Si_2O_5(OH)_4$ ) peuvent aussi apparaître (Kim et al., 2004).



Même si les minéraux argileux et les phyllosilicates (illite – smectite) sont moins altérables que des minéraux primaires silicatés présents dans la plupart des roches ignées (pyroxène, péridots...), ils représentent avec les carbonates et la silice, l'essentiel de la fraction minérale des sols.

De même, lorsqu'ils sont présents, l'oxydation de composés soufrés réduits comme les sulfures (pyrite  $FeS_2$ ) par le dioxygène dissout ou l'oxygène atmosphérique, génère des quantités d'acides assez importantes (Eq. 3 & 4), favorables à la mobilité des métaux de transition (Fe, Cu, Co, Ni, Al...) (Bailey & Peters, 1976; Lawson, 1982; Manaka, 2009). Ces réactions d'oxydo-réduction conduisent aussi à la formation et à la précipitation de sels sulfatés hydratés ( $Fe_2(SO_4)_3 \cdot nH_2O$ ), très réactifs avec les matrices carbonatées (Eq. 5). Dans le cas des sols lessivés bien tamponnés (carbonates) ou à faible teneur en sulfure, l'oxydation des sulfures modifie sensiblement mais très faiblement le pH. Au contraire dans les sols dégradés, peu tamponnés ou légèrement acides, cette oxydation entraîne une chute importante

du pH (pH 2 à 3) et modifie fortement les propriétés physiques et nutritionnelles du sol (van Breemen, 1973; Bloomfield & Coulter, 1974; Dent, 1980; Marius, 1984).



Ces processus d'oxydo-réduction et d'acidification associés au soufre sont régulés par la disponibilité de l'oxygène et dépendent donc du degré de saturation ou de l'hydromorphie des sols.

Ainsi, le maintien des conditions altérantes « acides » dépend des conditions hydriques et thermiques des sols, de la nature des minéraux présents dans la roche mère et de la quantité et de la qualité de composés organiques présents. Le niveau d'acidité détermine alors la stabilité et la disponibilité des éléments chimiques, cations et anions en solution, en favorisant ou non la néoformation de phases précipitées et le piégeage d'éléments minéraux. Généralement, lorsque les éléments sont chimiquement stables sous forme de cations (métaux de transition comme le fer) leur solubilité diminue lorsque le pH augmente. Inversement lorsque les éléments sont chimiquement stables sous forme d'anions (sulfates, phosphates), leur solubilité augmente avec le pH (Deneux-Mustin et al., 2003).

### 1.2 Influence des ligands organiques sur la dissolution minérale

En plus de l'effet de l'acidité des solutions sur la dissolution minérale, la présence de ligands organiques ou minéraux modifie durablement la solubilité des éléments cationiques et anioniques des sols. En particulier, les composés organiques acides jouent un rôle majeur au sein des processus d'altération minérale des écosystèmes continentaux. Leur nature très variée, leur réactivité et leur stabilité déterminent et orientent durablement ces processus d'altération minérale (Powell et al., 1980; Ehrlich, 1981; Berthelin, 1983; Leyval et al., 1990; Gadd, 2007; Ferret et al., 2014).

Ces ligands organiques, principalement des acides aliphatiques, sont produits lors de la décomposition des litières par les microorganismes et les racines des plantes. Leur

concentration, généralement proche de la millimole, varie en fonction du type de sol et des conditions édaphiques (Drever & Stillings, 1997).

Ces composés organiques solubles dans les solutions du sol sont aussi rapidement dégradés par la microflore du sol, qui les utilise comme sources de carbone et d'énergie (van Hees et al., 2003).

Les acides organiques poly-carboxyliques sont les plus couramment observés dans les processus d'altération minérale (e.g. acides succinique, malique, oxalique, citrique...) en raison de leur caractère acide et de leur capacité à former des complexes pluridendates plus stables (Berthelin, 1983). Les bactéries et les champignons du sol sont les plus actifs dans ce domaine. La production d'acide oxalique, citrique, gluconique à des concentrations comprises entre la micromole et la millimole est suffisante pour altérer des micas, comme le phlogopite ou la biotite (Robert & Berthelin, 1986; Drever & Stillings, 1997). Ce processus, dit de complexolyse, a pu être observé expérimentalement en présence de champignons mycorhiziens (i.e. *Laccaria laccata*) ou de bactéries hétérotrophes (i.e. genres *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhanelia*, *Agrobacterium*) (Leyval & Berthelin, 1991). Dès que l'acidité diminue (pH >5), les acides carboxyliques, citrique et gluconique, ont une action significative sur l'altération des phyllosilicates (micas, smectites) en réagissant avec les métaux présents à la surface des particules minérales pour former des complexes (Boyle et al., 1974; Balland et al., 2010; Oulkadi et al., 2014). Ces complexes organo-métalliques facilitent la mobilisation des éléments nutritifs nécessaires au développement des plantes et des microorganismes.

De plus, l'excrétion de molécules complexantes spécifiques dans la solution du sol, comme les sidérophores, assure la fixation des oligo-éléments essentiels comme le fer, le zinc, le manganèse ou encore le cuivre, même lorsque ceux-ci sont présents à l'état de trace, i.e. pour des concentrations largement inférieures à la micromoles (Brantley et al., 2001; Kalinowski et al., 2004). Ces sidérophores ont une très grande affinité pour le fer ( $10^{32} \text{ M}^{-1}$ ), et nettement supérieure à celle d'acides carboxyliques comme l'acide oxalique ( $10^8 \text{ M}^{-1}$ ). Par leur capacité de chélation remarquable et des concentrations non négligeables dans les sols voisines de la micromole, les sidérophores favorisent de manière significative les processus d'altération, notamment pour des minéraux ferrières (oxydes et smectites) (Gadd, 2007; Ferret et al., 2014).

Quelle que soit leur origine, ces composés organiques acides ou complexants participent à la mobilité et à la disponibilité des nutriments et des éléments minéraux essentiels (Berthelin, 1983; Robert & Berthelin, 1986; Ullman et al., 1996; Welch & Ullman, 2000; Calvaruso et al., 2006). Les plantes et les microorganismes peuvent ainsi via la synthèse des ligands

organiques altérer les minéraux, faciliter leur nutrition et améliorer les qualités nutritionnelles de substrats minéraux.

### 1.3 Altération par oxydo-réduction

Le potentiel d'oxydo-réduction des solutions est aussi une grandeur déterminante pour la solubilisation ou non des minéraux des sols. Toute modification de l'état d'oxydation des métaux constitutifs des minéraux déforme et fragilise l'édifice cristallin (Bienfait et al., 1983). Ces réactions redox sont suffisantes pour induire directement une solubilisation des minéraux concernés ou accentuer leur réactivité vis à vis de composés acides ou complexants. De plus dans les sols, sédiments et roches en présence ou en l'absence d'oxygène, certains groupes de bactéries utilisent des phases minérales comme donneurs ou accepteurs d'électrons afin de répondre au coût énergétique métabolique. Elles participent efficacement aux cycles oxydo-réductif et géochimiques de certains métaux (e.g. le fer, manganèse), sans qu'un contact physique cellule-particule avec le minéral soit nécessaire (Mustin et al., 1992; Toniazzo, 1998; Cruz et al., 2005). Ainsi, trois grands processus microbiens sont à l'origine de la dissolution des oxydes de fer dans des sols hydromorphes et riches en matières organiques : la respiration anaérobie, la production de molécules extracellulaires, et les cycles fermentaires. Lors de la respiration anaérobie bactérienne, le fer (III) structural constitue l'accepteur d'électrons en remplacement de l'oxygène. Certaines enzymes (e.g. hydrogénases) utilisées au sein des cycles fermentaires participent aussi à la réduction efficace du fer (III) en condition anaérobie ou microaérophile (Pelmont, 2012). Des métabolites ou constituants pariétaux, possédant des noyaux de type quinone, servent de navettes à électrons extracellulaires assurant le transfert des électrons entre la cellule et le minéral distant. Sous leurs formes protonées et réduites (catéchol, hydro-quinone), ces navettes s'adsorbent sur les minéraux ferrifères (oxydes de fer, smectite...) et leur transfert des électrons au fer(III) avant d'être réduites à nouveau dans l'environnement cellulaire, par exemple par des hydrogénases (Lovley et al., 1996; Newman & Kolter, 2000; Kostka et al., 2002a). D'autres molécules organiques, particulièrement stables, et peu dégradables, synthétisées par voie bactérienne ou végétale participent aussi aux processus d'oxydo-réduction. Les substances organiques naturelles à fort degré d'aromaticité, comme certaines substances humiques, tanniques, riches en groupements phénoliques ou quinoïques peuvent servir de navettes à électrons vers le fer (III) et ainsi réguler le caractère oxydant du fer ferrique sur les minéraux du sol et diminuer l'oxydation du fer ferreux par voie bactérienne. Il est également possible de réguler « artificiellement » les activités bactériennes impliquées dans les processus directs ou

indirects d'oxydo-réduction et d'altération minérale par l'ajout d'agents inhibiteurs à effet bactéricide, bactériostatique ou réorienter les genres, les espèces ou les activités métaboliques bactériennes du sol en relations ou non avec les plantes au sein de la rhizosphère.

## **2 Processus biogéochimiques induits par les associations plante-microorganismes :**

Les plantes induisent des modifications de la solubilité des nutriments à l'aide de processus d'exsudation de molécules organiques (Brown & Ambler, 1973). Cette synthèse d'exsudats et de métabolites chélatants dans la rhizosphère<sup>1</sup> a un effet déterminant dans la mobilité et le transfert à la plante de certains éléments nutritifs ou de contaminants métalliques.

### *2.1 Influence des plantes et de la rhizosphère*

Pour répondre à leurs besoins physiologiques et métaboliques, les plantes absorbent l'eau et les éléments minéraux via leur système racinaire qui colonise massivement le sol en surface et profondeur. Les racines fracturent et fragmentent les roches et les particules minérales du sol (Denef et al., 2002). Cette altération physique conduit à l'exposition de nouvelles surfaces minérales réactives et disponibles pour les processus d'altération chimique végétale ou microbienne. Il en résulte des modifications des concentrations ioniques et du potentiel de l'eau au sein du compartiment rhizosphérique<sup>1</sup> (Hinsinger, 1998). Ainsi, les interactions entre les racines et leur environnement induit des modifications de pH (Hinsinger et al., 2003), de potentiel rédox (Marschner, 2012), et, *in fine*, de la biodisponibilité d'éléments nutritifs ou non (Hinsinger, 1998; Marschner, 2012). Afin de soutenir leur besoin nutritionnel, les plantes modifient le pH de la solution du sol par l'excrétion de protons, d'ions hydroxyles ou bicarbonates aux alentours de leurs racines. Lors des processus d'exsudation d'anions au niveau racinaire, des protons et des ions  $K^+$  sont excrétés pour garantir le maintien de l'électroneutralité racinaire (Jones & Darrah, 1994; Hinsinger et al., 2003). Dans des périodes de carences nutritives, la plante va aussi excréter une forte quantité d'ions  $H^+$  afin de répondre au stress nutritif par la dissolution de minéraux.

Ces processus d'absorption et d'excrétion d'ions en liens avec les activités des végétaux et des microorganismes modifient les concentrations des éléments en solution au sein de la rhizosphère. En fonction du sol, de la plante, et de ses besoins physiologiques, des éléments

---

<sup>1</sup> La rhizosphère est définie comme le compartiment du sol sous l'influence directe des racines et de leurs exsudats (Darrah, 1993)



essentiels ou non peuvent se retrouver en excès dans les solutions rhizosphériques et précipiter au voisinage des racines, si la saturation est atteinte. A l'inverse, lorsque l'absorption est trop importante ou que les précipitations prédominent, des carences en oligoéléments essentiels à la croissance des plantes peuvent apparaître. Ainsi, la présence de grandes quantités de sulfates, phosphates, ou de carbonates diminuent drastiquement la disponibilité des éléments cationiques en solution. De même la présence d'oxy-hydroxydes de fer modifie l'équilibre anionique des solutions de sols en contrôlant la disponibilité des oxy-anions : hydrogénocarbonates, phosphates et sulfates (Barrow, 1970; Hingston et al., 1974; Parfitt, 1979; Willett et al., 1988).

De plus, le développement de plantes et de leurs systèmes racinaires injecte différentes molécules organiques riches en carbone et azote au sein de la rhizosphère. Cette production de métabolites par les racines est souvent accompagnée par l'excrétion de protons, provoquant une diminution du pH et une altération plus ou moins prononcée des minéraux (Berthelin, 1988). Les microorganismes y trouvent aussi des sources de carbones comme sources énergétiques pour répondre à leurs besoins métaboliques, tels que la croissance. C'est « l'effet rhizosphère » (Whipps, 2001) qui induit à la fois un effet quantitatif en favorisant les processus d'altération et le développement des microorganismes et un effet qualitatif sur la diversité microbienne rhizosphérique en sélectionnant également certains genres, espèces, familles ou populations de bactéries (Corgie et al., 2004).

## 2.2 *Les activités microbiennes rhizosphériques*

Les variations d'acidité et de conditions oxydo-réductrices les plus importantes sont généralement observées entre le sol rhizosphérique riche en microorganismes et le sol non rhizosphérique peu fragmenté et réactif (Marschner et al., 1986). Elles résultent des activités microbiennes intenses qui se déroulent dans la rhizosphère. Les sources de carbones utilisées par les microorganismes sont généralement issues des exsudats racinaires, du mucilage, ou des cellules desquamées de la coiffe racinaire. Ces molécules carbonées sont composées d'acides organiques, d'acides aminés et de sucres métabolisables par les bactéries et champignons (Marschner et al., 1997). Les bactéries et champignons rhizosphériques ainsi stimulés vont eux-mêmes synthétiser une grande variété de molécules organiques ou inorganiques capables d'altérer les minéraux du compartiment rhizosphérique. Outre les acides organiques, les microorganismes rhizosphériques excrètent dans leur environnement des macromolécules telles que des polysaccharides, qui modifient l'activité de l'eau et la disponibilité de l'oxygène au voisinage des racines. Ces molécules influencent de manière

positive ou négative les processus d'altération des minéraux selon deux mécanismes : en favorisant la complexation des ions présents ou en inhibant de manière irréversible les sites réactifs présents à la surface du minéral (Welch & Vandevivere, 1994; Barker et al., 1997; Welch & Ullman, 2000).

Leyval & Berthelin (1989) ont mis en évidence le rôle positif des microorganismes rhizosphériques sur le développement de végétaux du fait de la mobilisation d'éléments nutritifs (e.g. calcium et potassium) issus de l'altération d'éléments silicatés. Des métabolites secondaires non-essentiels à l'écophysiologie du végétal peuvent être exsudés comme les terpénoïdes, les flavonoïdes ou les coumarines (Singer et al. 2003) et peuvent sélectionner des microorganismes, symbiotiques ou non, capables de les métaboliser. Ainsi, les plantes de la famille des *Lamiaceae*, telles que les lavandes et lavandins, modifient leur cohorte de champignons mycorhiziens. Ces derniers synthétisent des acides carboxyliques qui ont un effet sélectif sur les communautés bactériennes rhizosphériques et améliorent la solubilisation des éléments nutritifs nécessaires à la plante (Ouahmane et al., 2006a; Duponnois et al., 2011). Les plantes mycorhizées ont ainsi facilement accès à des éléments nutritifs, peu disponibles pour les plantes non-mycorhizées. Ceci leur procure généralement une meilleure résistance à la sécheresse (Subramanian et al., 1997 ; Subramanian et Charest, 1998; Azcon-Aguilar et al., 2003). Leyval et al. (1990) et Calvaruso (2006) ont mis en évidence une altération des phyllosilicates, et une mobilisation du fer et du phosphore plus importantes par des bactéries rhizosphériques que par des bactéries non rhizosphériques.

Ainsi, les processus d'altération des minéraux du sol sont amplifiés en présence de plantes et des microorganismes associés. Cependant, certains composés organiques produits par des plantes peuvent au contraire avoir un effet inhibiteur de l'activité microbienne et pourraient ainsi contribuer, au contraire, à réduire les phénomènes d'altération ou d'oxydation minérale, et principalement des sulfures (Berthelin et al., 1974; Mustin et al., 1992; Meline et al., 1996).

### **3 Formation et réactivité de l'argilite du Callovo-Oxfordien**

#### *3.1 Formation et composition*

##### *3.1.1 Formation sédimentaire des argilites*

Les interactions fluide-roche à basse température sont à l'origine de l'érosion des continents et du dépôt d'argiles dans les bassins sédimentaires. Au cours de leur enfouissement au sein des bassins sédimentaires et de l'enfoncement du socle du bassin, ces sédiments aux structures instables, vont évoluer en fonction des conditions de température, pression et

perméabilité. La diagenèse précoce (i.e. moins de 50°C) des sédiments débute après l'interface sédiment-eau de mer (Rousset, 2002). Des échanges avec l'eau de mer sont engendrés par diffusion chimique (Sayles & Mangelsdorf, 1977) et favorisent la cristallisation de smectites (e.g. montmorillonite) (Steinberg et al. 1987).

L'argilite du Callovo-Oxfordien (COx) est une roche argileuse sédimentaire formée il y a 160 millions d'années sous des conditions réductrices et anoxiques. Cette couche géologique d'une épaisseur de 130 mètres se situe entre 420 et 550 mètres de profondeur. La formation des argilites est un processus lent. La texture (structure et composition) des sédiments primordiaux a évolué progressivement en fonction des conditions de température, pression et perméabilité pour former *in fine* une roche indurée meuble, composée majoritairement de phyllosilicates, de carbonates (calcite) et de silice (quartz). Lors des étapes de diagenèse précoce du sédiment, des échanges chimiques par diffusion avec l'eau de mer ont favorisé aussi la cristallisation de minéraux argileux de type smectites, comme les montmorillonites (Sayles & Mangelsdorf, 1977; Steinberg et al., 1987). Lors de l'enfouissement les smectites se sont transformées en partie pour former des structures argileuses interstratifiées de type illite-smectite (Lanson, 1990).

La présence d'interstratifiés et de minéraux gonflants à forte surface spécifique comme les smectites confère une grande réactivité aux argilites, dès que les conditions de confinement et de consolidation ne sont plus respectées (hydratation, fissuration...).

### 3.1.2 Composition des versés d'argilite

D'après Rousset (2002), Scholtus (2003), Hautevelle (2005) ou Lerouge et al. (2011) l'argilite est une roche silteuse carbonatée contenant trois phases minéralogiques principales : les minéraux argileux, le quartz et les minéraux carbonatés principalement sous forme de calcite. Les minéraux argileux constituent 40 à 60 % de la roche, le quartz de 15 à 35 % et la calcite de 20 à 40 %. Les principaux minéraux argileux sont les phyllosilicates comme le mica, l'illite (30 à 40 %), la chlorite (<10 %), la kaolinite (0 à 30 %), la montmorillonite et un interstratifié illite/smectite plus ou moins riche en illite ou smectite en fonction de la profondeur (10 à 80 %). La présence d'autres minéraux comme les feldspaths et la dolomite sont présents à un faible pourcentage. Les carbonates sont présents sous forme de cristaux de calcite disséminés au sein de la matrice argileuse. Ils diminuent la perméabilité de la roche ( $10^{-11}$  à  $10^{-13}$  m/s). L'argilite est une roche indurée du fait de sa faible teneur en eau (4 à 8%), de la compaction par le poids des strates supérieures, et de sa composition minéralogique (Rousset, 2002). Des sulfures de fer de type pyrites framboïdales ont également été observées

(0 à 2 %), ainsi que de fortes quantités de sodium, chlorures, sulfates issus de l'eau de mer résiduelle au sein des sédiments. En raison d'une proportion de carbonates, le pH est fortement tamponné à des valeurs proches de 9 (8,7). Cet environnement basique conduit à une faible disponibilité des oligo-éléments comme le fer, le manganèse, le cuivre et le zinc. La faible concentration initiale et la forte rétention sur la calcite, la dolomite, l'oxyde de fer et l'aluminium font que le phosphore est peu disponible. Une faible quantité de matière organique immature et certainement très réactive, du fait des conditions réductrices avant excavation, a été mise en évidence.

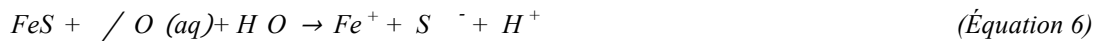
Toutefois, l'argilite, une fois exposée à l'air libre, est soumise aux aléas météorologiques et conditions climatiques, générant l'alternance de phases d'imbibition et de dessiccation, de gel et dégel ou l'apparition de conditions oxydantes en surface. Elle subit ainsi des modifications physico-chimiques importantes et s'altère. De plus, des perturbations biologiques par le développement de plantes et de bactéries peuvent également engendrer des dégradations physiques et chimiques irréversibles du substrat argileux. Afin de garantir l'intégrité de l'argilite en surface à long terme, il est essentiel d'évaluer et de réduire l'impact des perturbations physico-chimiques et biologiques, afin de ne pas annihiler ses propriétés d'imperméabilité, résistance mécanique, et sorption des radionucléides requises pour le remblaiement des ouvrages du centre de stockage.

### 3.2 *Processus d'oxydation des sulfures*

Plusieurs millions de mètres cubes d'argilite, issus de la réalisation des ouvrages de stockage, sont soumis aux conditions oxydantes de surface et aux contraintes climatiques. Ce changement brutal de conditions physico-chimiques déstabilise l'argilite. Cette exposition à l'air engendre des modifications physico-chimiques profondes et altère les propriétés géomécaniques de l'argilite. L'élément initiateur de l'altération physico-chimique de l'argilite est l'oxydation des sulfures des pyrites de petites tailles et des ammonites pyriteuses (Charpentier et al., 2001; Tinseau et al., 2006). Cette première phase a ainsi pour conséquence la formation de phases minérales secondaires par la mise en solution d'éléments minéraux. On distingue plusieurs voies d'oxydation des sulfures qui agissent de façon simultanée : oxydation chimique par l'oxygène de l'air et aqueux ; oxydation électrochimique (Bailey et Peters, 1976; Lawson, 1982) ; oxydation par le fer ferrique (Garrels et Thompson, 1960; Perdicakis et al., 2001) et oxydation bactérienne (Mustin et al., 1992; Toniazzo, 1998; Pisapia et al., 2007). Toutefois, en conditions naturelles, leur action concomitante et synergique ne permet pas de les identifier séparément.

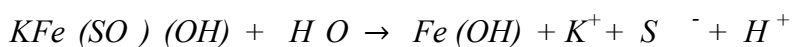
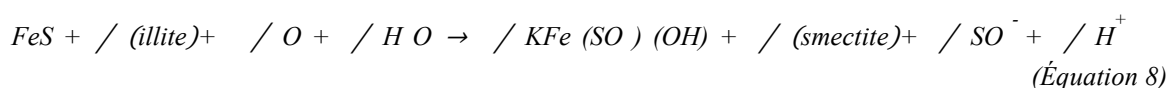
### 3.2.1 Oxydation chimique par l'oxygène de l'air et aqueux des sulfures de fer

L'oxydation rapide aérobie des sulfures présents dans les matrices argileuses est décrite comme l'un des mécanismes majeurs de gonflements et d'altération des schistes carton lorrains (Toarcien) (Rakotondratsima, 1995). Dans l'environnement du site de stockage riche en carbonates réactifs, le fer (II) et du di-sulfure (S-S<sup>2-</sup>) des pyrites framboïdales s'oxydent principalement par voie aqueuse en présence d'oxygène dissous ou de fer ferrique. Ce sont des processus locaux à l'échelle du grains ou de la surface minérale (Perdicakis et al., 2001; Pisapia et al., 2007) qui se traduisent par l'apparition d'eaux de lessivage acides fortement chargées en sulfates et en fer ferreux (Nicholson et al., 1988; Ciminelli & Osseio-Asare, 1995; Manaka, 2009). La forme réduite du fer est alors oxydée en fer ferrique par l'oxygène dissous. Deux équations résument le phénomène (Eq. 6 & 7) :



D'après Charpentier et al. (2001) la solution sulfatée acide est neutralisée par les phyllosilicates présents tels que l'illite, l'interstratifié illite/smectite, biotite, feldspath (Eq. 3, Puura et Neretnieks, 2000) et par la matrice carbonatée comme la calcite et la dolomite (Eq. 8, Ritsema et Groenenberg, 1993) :

- Conversion incongruente de l'illite en smectite et jarosite (neutralisation par les phyllosilicates) :



- Formation de gypse et d'oxydes de fer (neutralisation par les carbonates actifs) :



Cette interaction permet la dissolution de calcite et des phyllosilicates respectivement riches en strontium (Sr) et potassium (K). L'apport de ces minéraux entraîne l'apparition de phases minérales secondaires comme la célestine riche en Sr, et la jarosite riche en K. La formation de jarosite est favorisée par la solution acide qui subsiste au niveau des zones riches en pyrite (Mustin, 1992). La neutralisation de l'acidité générée par des carbonates réactifs (calcite) est à

l'origine de la libération d'éléments alcalins ou alcalino-terreux (e.g calcium Ca) et de la néoformation de gypse et d'oxy-hydroxydes de fer (lépidocrocite ou goethite) plus ou moins bien cristallisés. En plus du strontium, potassium et calcium, d'autres éléments tels aluminium (Al), sodium (Na), magnésium (Mg) et fer sont lixiviés (Scholtus, 2003). Ce résultat permet de confirmer la dissolution des phyllosilicates par l'eau acide présente aux abords des pyrites oxydées. Cette libération d'ions a pour conséquence une forte salinité des lixiviats collectés pouvant aller jusqu'à  $2 \text{ g.l}^{-1}$  (Scholtus, 2003). De plus, l'évolution chimique de ce fluide est favorisée par l'alternance de cycles de déshydratation qui ont pour conséquence une amplification de la saturation en sels des lixiviats et la formation des phases minérales secondaires. Notamment, la formation de gypse a pour conséquence de fracturer l'argilite par augmentation du volume molaire. La cristallisation du gypse affecte les propriétés mécaniques du dépôt en générant des couches d'altération résiduelles pulvérulentes. Ces zones de désagrégation poreuses sont très friables et progressent dans l'ensemble du matériel en fonction des cycles de dessiccation (Rakotonratsima, 1995). En surface des verses âgées ou ayant subi des phases d'imbibition et de déshydratation, une zone blanchie indurée est observable (Figure 1). Cette croûte anhydre est certainement composée de précipités de sulfate de calcium ( $\text{CaSO}_4$ ).



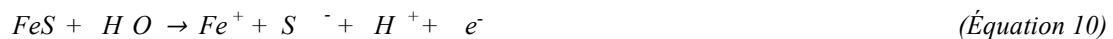
Figure 1 : Photographie de la surface d'une verse âgée (Bure, 26/10/2012)

### 3.2.2 Oxydation électrochimique des sulfures de fer en milieu acide

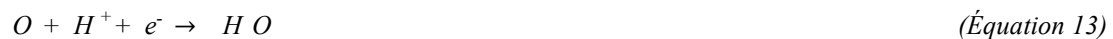
Du fait de leur composition, les sulfures comme les pyrites sont des minéraux semi-conducteurs dont les propriétés électriques (résistivité) varient en fonction de la température, l'orientation cristalline ou de la nature et du taux d'impuretés métalliques présents dans la maille cristalline. L'arsenic, le cuivre et le cobalt sont les principaux éléments dopants qui affectent les propriétés électrochimiques des pyrites en modifiant les potentiels donneur (type n pour Cu) ou accepteur (type p pour As) d'électrons des surfaces minérales. Peters et Majima (1968) ont déterminé les réactions anodiques et cathodiques impliquées dans l'oxydation

électrochimique des pyrites en phase aqueuse. En présence d'eau acide et en conditions aérobies, les réactions anodiques de la pyrite conduit à la formation d'ions ferriques, sulfates et de soufre élémentaire (Eq.10 et 12) (Singer et Stumm, 1970). Pour des pH voisins de la neutralité, la libération d'ions ferreux favorise la formation d'oxy-hydroxyde de fer (Eq.11) (Ehrlich, 1981). Sur les sites cathodiques, l'oxygène ou le fer ferrique sont réduits par transfert d'électrons (Eq.13 à 15). Le fer ferreux ainsi formé peut être ré-oxydé par voie chimique ou bactérienne (Eq.16). D'après Nordstrom et Alpers (1997), cette oxydation électrochimique de la pyrite par le fer ferrique est un phénomène rapide et ubiquiste qui a un rôle prépondérant dans l'altération des sulfures; leur oxydation par l'oxygène de l'air étant bien plus lente (Eq. 6).

- Réactions anodiques :



- Réactions cathodiques de réduction de l'oxygène et du fer ferrique:



Le soufre élémentaire ou le fer (II) produits par ces réactions électrochimiques constituent alors de nouvelles sources d'énergie pour les bactéries (Mustin et al. 1993).

### 3.2.3 Oxydation bactérienne des sulfures de fer

L'oxydation bactérienne est couplée aux processus d'oxydations chimique par l'oxygène, électrochimique et ferrique (Brierley, 1978; Torma & Bosecker, 1982). L'activité de certaines bactéries telles *Acidithiobacillus ferrooxidans* augmente considérablement la vitesse d'oxydation de la pyrite (Berthelin, 1987; Mustin, 1992) en ré-oxydant le fer ferreux (Eq. 16) issu de l'oxydation chimique de la pyrite (Eq.14). En effet, en conditions abiotiques (Pisapia et al., 2007), l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique par l'oxygène aqueux (Eq. 7) est une étape limitante pour l'oxydation électrochimique des pyrites par le fer(III) (Eq. 10). Les vitesses de réactions d'oxydation du fer (II) en fer (III) sont de l'ordre de  $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  en présence de bactéries, alors qu'elles sont de  $3 \cdot 10^{-12} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  en conditions abiotiques.

- Réactions d'oxydation du fer ferreux par voie bactérienne :



La régénération bactérienne du fer ferrique est à l'origine d'un cycle oxydatif autocatalytique qui provoque une altération très rapide des sulfures. Ainsi, comme pour l'oxydation chimique, les ions sulfates et ferriques produits au cours des oxydations électrochimiques et bactériennes conduisent à la précipitation de jarosite et célestine (Charpentier et al., 2001).

#### 3.2.4 Oxydation des sulfures de fer en milieu neutre

De nombreuses études sur l'altération des pyrites ont été réalisées en conditions acides avec des valeurs de pH inférieures à 2 (Moses et al., 1987; Mustin et al., 1992; Meline et al., 1996). Avec ces conditions expérimentales la solubilité du fer est maximale. Ce dernier est ainsi l'acteur prédominant de l'oxydation des pyrites (Eq. 14) (Moses et al., 1987). Cependant, au sein de milieu avec un pouvoir tampon efficace, le pH obtenu est proche de la neutralité. Du fait de la faible disponibilité du fer en milieu neutre, les processus d'altération électrochimique des sulfures de fer, rencontrés en milieu acides, ne peuvent pas se produire. De ce fait, l'oxygène de l'air ou aqueux est ainsi le principal oxydant du milieu. Ainsi, Moses & Herman (1991) ont étudiés les mécanismes d'oxydation électrochimique de la pyrites au sein d'une milieu dont le pH est proche de la neutralité. Le fer peut ainsi s'adsorber aux sulfures de fer et être oxydé par l'oxygène aqueux. Le fer ferrique produit par oxydation du fer ferreux peut alors oxyder les sulfures de fer présents.

Ainsi, les voies potentielles d'altération chimique et bactérienne des principaux constituants minéraux de l'argilite sont synthétisées par la Figure 2 :



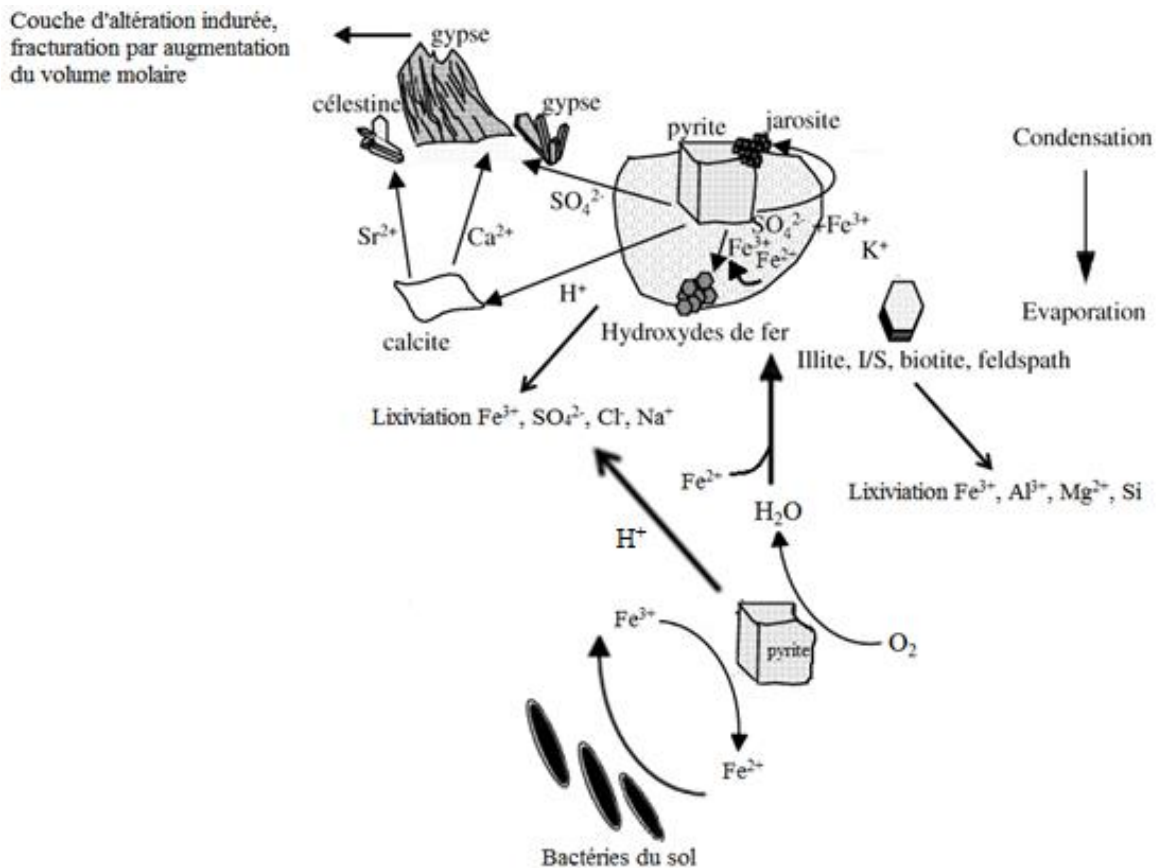


Figure 2 : Schéma des processus de l'altération de l'argilite par oxydation des pyrites (d'après Charpentier et al. 2001)

### 3.3 Altération des carbonates

L'argilite est une roche à matrice argileuse (40 à 60%) ayant une proportion non négligeable de carbonates sous forme de calcite (30 à 40%) et de dolomite sous forme de traces (Hautevelle, 2005). Les carbonates du COx sont très réactifs (peu de dolomie) et sont facilement altérés par voie acide. Les calcites progressivement libérées par la fissuration et le délitement de l'argilite sous l'effet des cycles imbibition /dessiccation tamponnent l'acidité et l'apport de fer et de sulfates en solution générés par l'oxydation des minéraux sulfurés. Les éléments ainsi libérés (e.g. fer, sulfates, calcium, magnésium) peuvent précipiter pour former des phases secondaires typique de l'altération de l'argilite comme le gypse, la célestine, la jarosite ou la goethite. Ainsi, les carbonates sont aussi à l'origine de la formation d'une croûte indurée en surface de l'argilite. Ce processus d'induration induit par la présence de carbonates et sulfures réactifs est favorisé par l'alternance des cycles d'imbibition et de dessiccation,

contrôlant à leur tour, la succession d'étapes de dissolution et de précipitation minérale (Charpentier et al., 2001).

### 3.4 *Altération des argiles*

La matrice argileuse de l'argilite est principalement composée de phyllosilicates tels que les smectites. Ces dernières ont la capacité de gonfler en présence d'eau. La propriété fondamentale de ces argiles est le défaut de charge présent au niveau des unités cristallines. L'électroneutralité des feuillets est ainsi perdue du fait de substitutions cationiques. De ce fait, la présence de cations compensateurs monovalents ou divalents au sein des espaces interfoliaires permet de stabiliser les unités cristallines (Stumm, 1992). Ces ions compensateurs sont en position échangeable et confèrent d'importantes propriétés d'adsorption de ces minéraux argileux (e.g. radionucléides). Leur réactivité provient de l'eau interfoliaire et de la présence de protons structuraux (OH) et libres dans l'espace interfoliaire. Ainsi, lors de la mise en surface de l'argilite, la matrice argileuse va subir des variations des conditions d'oxydo-réduction du système et des colonisations biologiques qui peuvent induire des modifications physico-chimiques. Les équilibres chimiques des phases argileuses de type smectite vont être modifiés et engendrer une intense réactivité. Du fait de l'activité métabolique des plantes et des microorganismes, les phyllosilicates peuvent être altérés par voie acide ou basique (Balland et al., 2010; Oulkadi et al., 2014). Les liaisons Fe-O et Al-O vont être mises en jeu dans un environnement au pH acide. Dans un environnement où le pH est basique, les liaisons Si-O vont être concernées. De plus, la vitesse de dissolution est maximisée, et ce, de manière exponentielle, dans des environnements où les valeurs de pH mesurées sont inférieures à 5 ou supérieures à 8. La dissolution des phyllosilicates est minimale dans la gamme de valeurs de pH centrale (i.e. valeurs de 5 à 8) qui sont celles généralement rencontrées dans les sols. Plus particulièrement au sein de notre substrat d'étude, l'argilite, la dissolution des phyllosilicates est maximum, du fait d'un pH tamponné à des valeurs supérieures à 8,5 (Scholtus, 2003). Concomitamment, au catabolisme de molécules organiques par les microorganismes ou lors de la respiration microbienne, les bactéries et champignons du sol peuvent synthétiser des acides organiques ou des chélateurs dans leur environnement (Neilands, 1984; Jones & Darrah, 1994; Ferret et al., 2014). Ces composés organiques peuvent ainsi diminuer le pH aux alentours des minéraux et engendrer une dissolution acide des argiles. Ces composés ont aussi un fort pouvoir complexant et peuvent jouer le rôle de ligand organique. Ils peuvent ainsi maximiser leur altération en s'adsorbant à la surface minérale des argiles et en modifiant l'équilibre physico-chimique du

milieu en se complexant aux ions en solution. Cependant le rôle des acides organiques sur l'altération des argiles est relativement faible en milieu naturel comparé aux concentrations étudiées en conditions de laboratoire. En effet, Golubev et al. (2006) ont réalisé une étude sur la dissolution de la smectite par divers ligands organiques les plus rencontrés dans les sols. Ainsi, l'altération des smectites a été permise pour des concentrations en ligands organiques de l'ordre du millimolaire (e.g. de 10 à 100 mM) en laboratoire comparé à des valeurs de l'ordre du micromolaire en conditions naturelles. Dans cette situation, le fer (III) serait mis en solution indirectement par les processus d'exsudation de composés chélatants, et non directement par réduction microbienne. Les bactéries peuvent également produire et excréter des chélateurs ayant une forte affinité pour le fer, comme les sidérophores, afin d'augmenter la biodisponibilité du fer dans leur environnement (Neilands, 1984; Hersman et al., 1995). Cependant, les microorganismes peuvent aussi excréter des polysaccharides, qui peuvent jouer un rôle inhibiteur ou facilitateur de l'altération des argiles. D'une part, ces molécules peuvent favoriser les processus de complexation des ions en solutions. D'autre part, ces composés peuvent s'adsorber sur les sites réactifs des minéraux et ainsi réguler ou stabiliser l'altération minérale (Welch & Vandevivere, 1994; Barker et al., 1998; Welch & Ullman, 2000). En outre, les bactéries peuvent également engendrer l'altération partielle des particules d'argile par dissolution (Kostka et al., 1999). De plus, la réduction bactérienne du fer (III) peut induire un déséquilibre de charge au sein des argiles, et, potentiellement entraîner une déstabilisation structurale minérale (Lantenois et al., 2005). À titre d'exemple, (Kim et al., 2004) ont noté que certaines bactéries pouvaient induire la modification de la smectite en illite. De par la réduction du fer (III), les smectites possèdent une forte augmentation des couches chargées négativement. De ce fait, ces modifications de charges vont induire la réduction de l'espace interfoliaire et la fixation de cation compensateur, comme le potassium.

#### **4 La phytoremédiation**

Les plantes peuvent participer à l'altération des minéraux, mais elles peuvent aussi diminuer l'érosion, stabiliser le sol ou les matériaux et contribuer dans certains cas à réduire la toxicité des polluants et sont ainsi utilisées pour la remédiation de sols contaminés. Le principe de ces techniques de phytoremédiation peut être envisagé et adapté à la stabilisation des versants d'argilite.

#### 4.1 Principes et mécanismes de phytoremédiation

La phytoremédiation, formée du préfixe grecque « *phyto* », signifiant plante, et du suffixe latin « *remedium* » pour nettoyer, fait référence à « l'utilisation des plantes et de leur microbiote associé, pour éliminer, contenir, ou rendre moins toxiques les contaminants environnementaux » (Cunningham et al., 1995). Elle s'applique à des sols qui présentent des concentrations potentiellement toxiques en éléments métalliques et/ou organiques, qu'il est nécessaire d'éliminer par des processus de dégradation, d'atténuation, de transformation ou d'extraction (Wenzel, 2009).

Plusieurs types de phytoremédiation (Figure 3) peuvent être envisagés selon la nature des contaminants, l'espèce végétale et les propriétés physico-chimiques du sol. L'accumulation des contaminants par la plante est directement liée à leur biodisponibilité dans le milieu, leur nature, leur état, leur type d'exposition (mono ou multiple, simultanée ou non) et leur dispersion dans le sol (ponctuelle ou diffuse). L'espèce végétale, sa physiologie et les échanges assurés avec le sol sont des éléments importants, de même que les propriétés de ce dernier (*e.g.* pH, texture, MO).

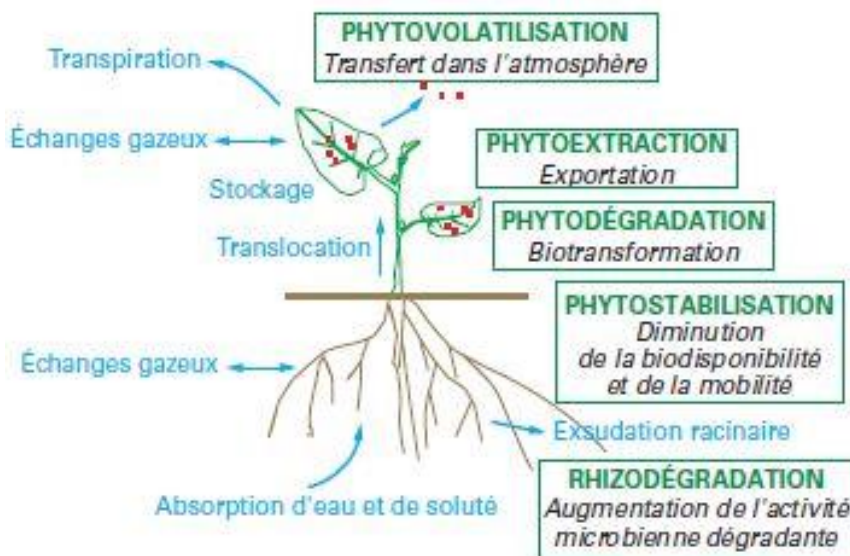


Figure 3 : Principaux mécanismes de phytoremédiation (Sterckeman et al., 2012)

La phytostabilisation et la phytoextraction sont des techniques généralement utilisées pour les polluants métalliques. L'objectif recherché par la phytostabilisation n'est pas d'éliminer les contaminants du site mais de les immobiliser, de réduire leur mobilité ainsi que les risques de dispersion par érosion des sols. La plante aide à stabiliser les contaminants par précipitation ou adsorption au niveau de ses racines. Elle peut également modifier certaines caractéristiques

du sol, tels que le pH, le potentiel redox, et ainsi altérer la forme chimique du contaminant et diminuer sa biodisponibilité. Les micro-organismes de la rhizosphère jouent un rôle aussi important dans ce cas. Ils contribuent activement à la spéciation des éléments traces métalliques et limitent leur phytotoxicité (Mastretta et al., 2006). Ils peuvent aussi améliorer la croissance des plantes sur les sols contaminés et améliorer leur résistance à la toxicité en diminuant le transfert des polluants dans les plantes (cas des champignons mycorhiziens, (Leyval et al., 1997).

La phytoextraction, ou phytoaccumulation, concerne aussi les pollutions par les éléments en traces métalliques. La plante absorbe l'élément nocif par les racines et le concentre dans ses parties aériennes. La récolte de ces parties aériennes permet de décharger progressivement le sol de ses contaminants, tout en respectant l'intégrité écologique du site. Plusieurs types de plantes sont utilisés dans ce cas. Des plantes dites « hyperaccumulatrices » qui sont capables de tolérer et d'extraire d'importants volumes de métaux toxiques dans les horizons de surface des sols (Chaney, 1983). Cette hypertolérance résulte de l'évolution adaptative de plantes dans des sites métallifères au cours de multiples générations. Actuellement, plus de 400 taxons, appartenant à au moins 45 familles de plantes, ont été identifiés (Reeves & Baker, 2000). La famille des Brassicacées est très riche en hyperaccumulateurs, en particulier les genres *Brassica*, *Alyssum* et *Noccaea*. Il est également possible d'utiliser des plantes modérément accumulatrices de métaux à croissance rapide et forte biomasse, comme le saule (*Salix* sp) ou le peuplier (*Populus* sp).

Dans le cas de pollutions organiques des sols, qui peuvent être transformés et dégradés, d'autres processus sont concernés : la phytodégradation, la phytovolatilisation, la phytostimulation et la rhizodégradation (Yadav et al., 2010). La phytodégradation, consiste à dégrader certains composés organiques à travers l'activité métabolique de la plante (e.g.. production d'enzymes déhalogénase, oxygénase). La seconde méthode, la phytovolatilisation, consiste en l'absorption du contaminant dans le sol, sa métabolisation sous forme gazeuse dans la plante et sa libération dans l'atmosphère. Elle concerne aussi certains polluants métalliques, comme le mercure, qui peuvent être volatilisés. La troisième, la phytostimulation, tient compte des interactions naturelles entre les plantes et les micro-organismes. Elle consiste en la stimulation de l'activité de biodégradation des contaminants organiques au niveau des racines, notamment *via* l'augmentation de l'infiltration des eaux et à l'aération lors du développement du système racinaire. La rhizodégradation est le processus de remédiation dans lequel les contaminants sont transformés par les microorganismes de la rhizosphère. Par les exsudats racinaires qu'elle libère dans la rhizosphère, la plante stimule

l'activité métabolique, et de ce fait, l'activité dégradante des communautés fongiques et bactériennes dans la rhizosphère.

Si les techniques de phytoremédiation sont le plus souvent appliquées à des sols contaminés, la phytostabilisation peut être adaptée et utilisée pour d'autres formes de stress environnementaux tels que l'adaptation à la sécheresse (Bochet et al., 1999), ou des conditions climatiques ou édaphiques défavorables (i.e. faible fertilité), où le choix des espèces végétales et les interactions plantes-microorganismes peuvent être déterminantes. Ainsi, au vu des surfaces d'occupation, et de la mise en pratique de la stabilité dans le temps des versées, la phytostabilisation est une technique qui mérite d'être évaluée. Cette approche de phytostabilisation des versées pourrait, de ce fait, répondre aux problématiques d'érosion potentielle et d'altération physico-chimique et biologique de l'argilite dans le temps.

#### *4.2 Application à la phytostabilisation des versées*

Une fois entreposée en surface, sous forme de versées, l'argilite est soumise à des conditions oxydantes et aux contraintes climatiques qui engendrent des modifications physico-chimiques profondes amplifiées par l'oxydation des sulfures, principalement des pyrites, qui conduisent à la libération de composés ferriques et sulfatés. L'altération des carbonates, des argiles, et des éléments ferrifères de l'argilite est favorisée par les activités métaboliques des plantes poussant spontanément sur les versées, les processus de développements bactériens associés ou non aux racines de plantes. Ainsi, les interactions plantes-sol-microorganismes catalysent les réactions d'altération de l'argilite stockée en surface. Le choix des plantes doit ainsi spécifiquement répondre aux contraintes édaphiques et climatiques du site à végétaliser, et également réguler ou annihiler les processus d'altération physico-chimique et microbiologique de l'argilite (Figure 4). Outre les contraintes établies, le choix des plantes d'intérêt a été réalisé à l'aide de l'étude de plantes se développant spontanément sur les versées.

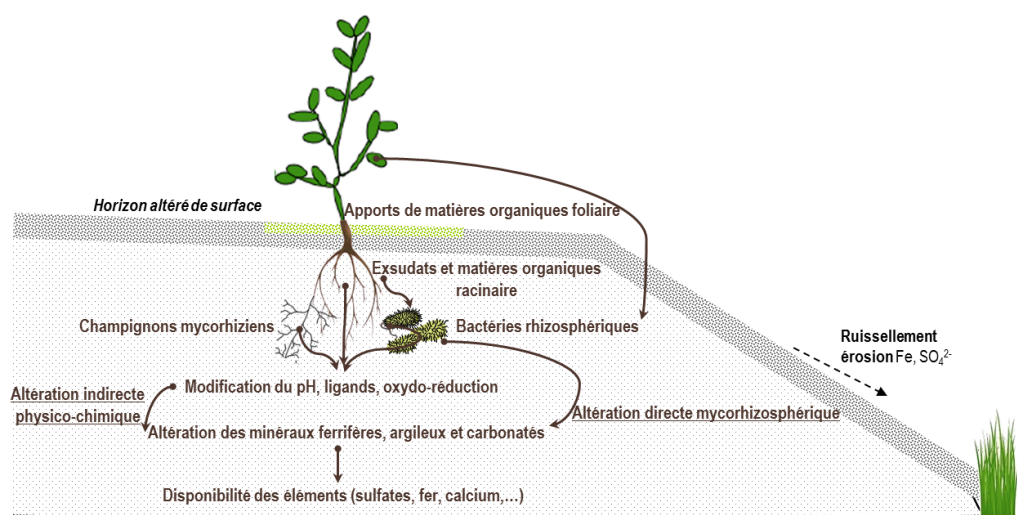


Figure 4 : Altération physico-chimique et microbienne de l'argilite par les interactions plantes-microorganismes.

Pour stabiliser les versées, il semble essentiel de réguler ou annihiler les processus d'altération minérale des principaux constituants de l'argilite stockée en surface sous forme de versées. Pour ce faire, le confinement sous couvertures géotextiles a été, dans un premier temps, envisagé (Kalin et Van Everdingen, 1988). La difficulté de ce procédé réside dans la mise en place et le maintien de l'étanchéité parfaite du système. Il faut également prendre en compte l'usure et le renouvellement du matériau enveloppant dans le temps. Du fait de l'importante surface à protéger, la végétalisation est une méthode qui mérite d'être évaluée. La végétalisation consiste à sélectionner et à favoriser le développement de plantes qui soient résistantes aux contraintes imposées par une surface dénudée. Celle-ci, étant moins onéreuse, implique une mise en place simplifiée et s'inscrit dans une démarche de développement durable. Scholtus (2003) a établi que la végétalisation par la fétuque et le lotier est possible sur un analogue argileux à l'argilite du Callovo-Oxfordien, l'argilite à Opalinus, qui a été envisagé pour le stockage du Mont Terri. Ainsi, la végétalisation des versées est envisageable. Néanmoins, cette végétalisation a conduit à l'altération de ce substrat sulfuré et à la lixiviation d'éléments minéraux (fer, soufre, aluminium). Toutefois, Perdicakis et al. (2001) et Méline (1995) ont montré que l'apport de substances terpéniques ou aromatiques, comme le thymol, produites par certaines plantes, peuvent limiter les phénomènes d'altération physico-chimique et biologique des sulfures de fer comme les pyrites. Le choix des plantes peut ainsi être envisagé en fonction de la production de telles molécules, afin de limiter ou annihiler les processus d'altération physico-chimique et microbienne de l'argilite. Par ailleurs, ces plantes doivent être adaptées aux contraintes édaphiques et climatiques du site à végétaliser.

Afin de stabiliser les vers, le choix de familles ou d'espèces végétales capables de synthétiser des composés racinaires et/ou aériens pouvant diffuser dans les sols et interagir directement ou indirectement sur l'altération minérale de l'argilite peut être envisagé (Figure 5). D'une part, pour limiter directement les processus d'altération minérale, ces composés doivent avoir la capacité de s'adsorber sur les éléments ferrifères, argileux, ou carbonatés de l'argilite afin de limiter les processus d'altération physico-chimique (i.e. attaque acide ou basique, oxydation minérale, ligands d'origine végétale ou microbienne, ...). D'autre part, ces molécules doivent pouvoir interagir avec la microflore du sol afin de stabiliser indirectement l'altération microbienne des minéraux. Dans ce cas précis, la régulation de l'altération des composés minéraux serait permise par des processus de réorientation de la microflore des sols, de régulation de la densité microbienne (i.e. composé bactériostatique), ou par destruction des populations microbiennes altérantes (i.e. composé bactéricide).

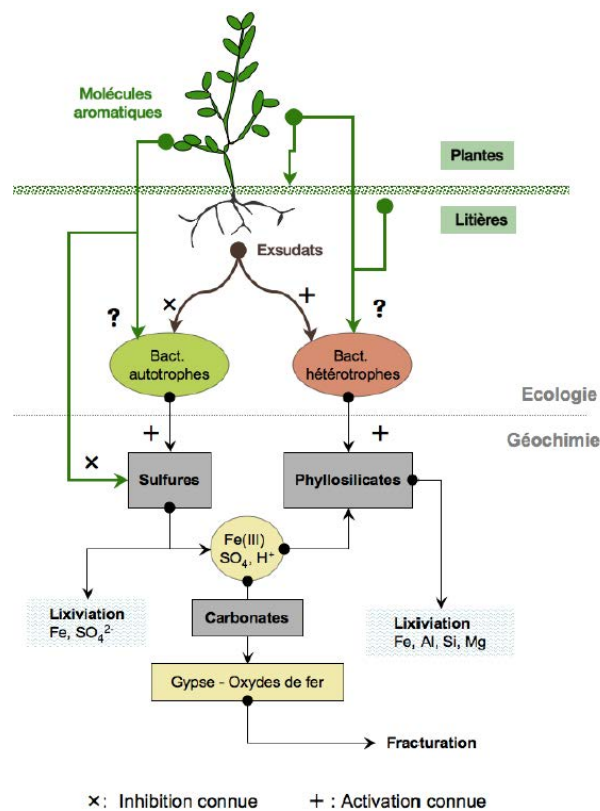


Figure 5: Hypothèse sur les processus de stabilisation de l'altération géochimique et microbiologique de l'argilite du Callovo-Oxfordien par des plantes



## 5 Objectifs de la thèse

Ce chapitre bibliographique a mis en exergue la complexité des processus impliqués dans l'altération des minéraux en général et qui vont affecter potentiellement l'argilite excavée. Ces processus impliquent trois principaux acteurs: le minéral, la plante et les microorganismes, et leurs interactions nombreuses, diversifiées, et complexes vont conditionner l'altération ou la stabilisation de l'argilite. Les plantes impliquées dans cette relation vont ainsi définir *l'habitus* des espèces, communautés et populations microbiennes (bactériennes, fongiques, mycorhiziennes...). Ces modifications sont intimement liées à l'écophysiologie de la plante (e.g. nutriments, réserve en eau, composés foliaires et racinaires), et, de ce fait, au développement du système racinaire et aux modifications géochimiques du sol sous leur influence : la rhizosphère. Les exsudats, la matière organique, ainsi que le mucilage racinaire vont favoriser le développement microbiologique rhizosphérique et ainsi stimuler les processus d'altération des minéraux. Les plantes peuvent également dégrader directement les minéraux lors de processus d'excrétion de molécules chélatantes, de composés organiques, ou d'ions. Ces dernières peuvent ainsi produire des molécules susceptibles d'intervenir, par la production de différentes molécules, directement sur l'altération minérale, mais aussi indirectement, *via* la modification des activités microbiennes. Les mécanismes généraux directs (i.e. altération bactérienne et végétale) et indirects (i.e. altération physico-chimique) de dégradation des minéraux ne sont pas pleinement dissociables. Mais l'hypothèse émise dans ce travail de thèse est que le choix de plantes produisant des molécules antioxydantes pouvait contribuer à limiter les processus d'altération de l'argilite et stabiliser les vers.

C'est dans ce contexte que s'intègre ce travail de recherche, qui a pour objectif principal de contribuer à la régulation des processus d'altération physico-chimique et microbiens de l'argilite du Callovo-Oxfordien par phytostabilisation. Afin de répondre à cet objectif, des études ont été menées à diverses échelles afin d'apprécier la complexité du système « argilite-plante-microorganismes », et d'étudier l'effet de composés antioxydant d'origine végétale en conditions contrôlées au laboratoire et *in situ*.

De ce fait, les objectifs de ce travail de thèse étaient (i) d'évaluer des familles ou espèces végétales pouvant potentiellement être utilisées pour la phytostabilisation physico-chimique et microbiologique des vers, (ii) étudier l'impact de composés organiques foliaires et/ou racinaires issus des plantes d'intérêt sur l'évolution physique, chimique et microbiologique de

l'argilite dans le temps, et (iii) évaluer l'impact de la végétation choisie sur la phytostabilisation d'une verse d'argilite *in situ*.

Ce travail de recherche s'articule donc en trois parties et fait appel à des compétences croisées en géochimie, microbiologie et physiologie végétale. La première partie des résultats consistait à identifier des familles végétales d'intérêt potentiel pouvant se développer sur l'argilite et stabiliser l'altération dans le temps (Chapitre III). Elle a permis d'identifier quelques plantes et des composés antioxydants d'origine végétale pour leur rôle potentiel sur l'inhibition de l'altération des sulfures sans présenter de forte toxicité.

La deuxième partie des résultats porte sur l'étude des effets d'antioxydants et d'apports de molécules organiques racinaires sur les propriétés physico-chimiques (pH, cinétique et quantités des éléments lixiviés du COx) et microbiennes (quantification de l'ADN du COx et des acides organiques) de l'argilite dans des dispositifs simplifiés au laboratoire (Chapitre IV). L'utilisation de molécules antioxydantes d'origine végétale étant très peu répertoriée dans la bibliographie, une série de questions se posait : à quelle concentration ces antioxydants permettent-ils d'inhiber ou réduire les processus d'altération de l'argilite ? Quel antioxydant permet l'inhibition de l'altération maximale ? Quelle est la durée de cette inhibition et est-elle corrélée à la capacité antioxydante des molécules ? Ces molécules ont-elles un effet direct et/ou indirect via un effet sur l'activité microbienne ?

Une première expérience en microcosmes en conditions contrôlées a été réalisée sur des systèmes simplifiés « eau-argilite », exposés à trois antioxydants (thymol, carvacrol, linalol) à trois niveaux de concentrations afin d'étudier un effet éventuel de ces molécules sur la disponibilité des éléments présents dans l'argilite dans un laps de temps court. Une deuxième expérience a été menée en complexifiant le dispositif avec de l'argilite enrichie en pyrite, traceur d'altération, en intégrant le compartiment biotique, à l'aide d'un ensemencement bactérien au temps initial, et en ajoutant une source de carbone reflétant les exsudats racinaires d'une plante. Deux antioxydants ont été étudiés (thymol et linalol) à trois niveaux de concentrations plus faibles. Cette expérience avait pour objectif d'étudier l'effet des antioxydants sur l'argilite en relation avec la stimulation ou l'inhibition des activités microbiennes et de suivre l'évolution des traceurs d'altération physico-chimique et biologique.

La troisième partie des résultats s'intéresse à la végétalisation *in situ* d'une verse d'argilite par des plantes naturellement riches en antioxydants et les conséquences en termes de développement de la plante, à l'aide de mesures de paramètres écophysologiques non

destructifs (i.e. hauteur et diamètre des plantes) ainsi que des paramètres écophysiologiques destructifs (i.e. biomasses aériennes et racinaires fraîches et sèches, ratio des antioxydants) sur les activités microbiennes, d'érosion, et de mobilisation des éléments minéraux (Chapitre V). Deux campagnes de culture ont été menées sur une verse âgée d'argilite excavée sur le site de Bure. Un premier essai a été réalisé avec le lavandin (*Lavandula x intermedia grosso*) et la lavande (*Lavandula angustifolia*) de la famille des Lamiacées, pour évaluer leur développement sur la verse, notamment les pratiques culturales à mettre en œuvre (durée de la pré-culture, irrigation, amendement, etc.) mais également étudier l'évolution de la densité microbienne et l'altération chimique et physique de l'argilite après douze mois de culture. Le lavandin a été choisi pour réaliser ensuite un essai de végétalisation plus dense sur une plus grande surface de la verse, en comparant la partie végétalisée à la partie nue de la verse. Un dispositif de récupération des eaux de ruissellement a été installé pour permettre l'étude de la disponibilité des éléments présents dans le milieu, indicateur supplémentaire de l'altération chimique de l'argilite. Des prélèvements d'argilite et de plantes ont été réalisés au bout d'un an.

La dernière partie vise à synthétiser et à discuter l'ensemble des résultats afin de proposer un modèle de fonctionnement du système argilite-plante-bactérie et de leurs interactions dans le cadre de la phytostabilisation des verses d'argilite (Figure 6) (Chapitre VI).

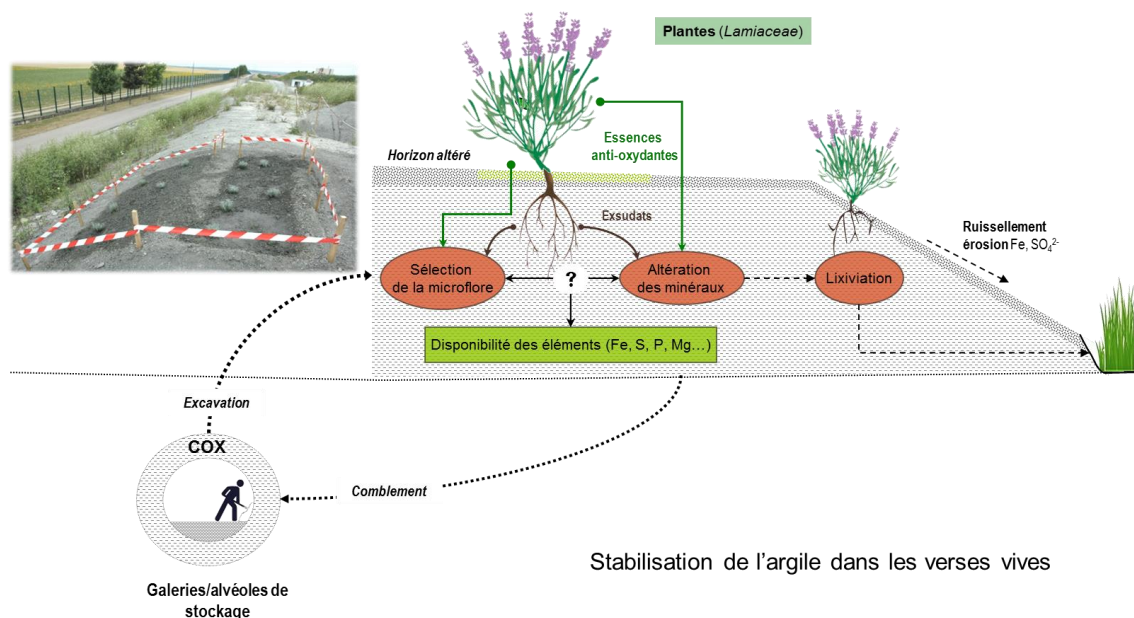


Figure 6 : Schéma de synthèse de stabilisation des interactions argilite-plante-microflore après excavation



## Chapitre II. Matériels et Méthodes

---



Ce chapitre décrit successivement les matériels et les méthodes employés, les expériences réalisées au laboratoire et *in situ*, et enfin les caractérisations et les outils analytiques communs à toute la thèse.

## 1 Argilite

L'argilite du Callovo-Oxfordien (appelée COx dans le manuscrit) provient du Centre de Meuse-Haute Marne de l'Andra situé à Bure (Meuse, France). Des lots d'argilite dite « fraîche » et « âgée » ont été utilisés au cours de ce travail. Les lots d'argilite « fraîche » ou fraîchement excavée, ont été prélevés dans les galeries en cours d'excavation, dans le cadre des études de confinement menées au sein du Laboratoire Souterrain. L'argilite âgée a été échantillonnée dans une verse stockée en surface et à l'air libre depuis une dizaine d'années.

### 1.1 Composition de l'argilite

Le COx employé dans ce travail est une roche silteuse carbonatée composée principalement de minéraux argileux, de quartz et de calcite (Tableau 1). C'est une roche indurée en raison de sa faible teneur en eau (4 à 8%), de la compaction par le poids des strates supérieures, et de sa composition minéralogique (Rousset, 2002). Les minéraux argileux constituent 40 à 60 % de la roche, le quartz de 25 à 35 % et la calcite de 15 à 40 %. Les principaux minéraux argileux sont les phyllosilicates comme le mica, l'illite (30 à 40 %), la chlorite (<10 %), la kaolinite (0 à 30 %), la montmorillonite et des inter-stratifiés illite/smectite plus ou moins riches en illite ou smectite en fonction de la profondeur (10 à 80 %). Elle contient accessoirement d'autres minéraux comme les feldspaths et la dolomite (<5%) ainsi que des sulfures de fer de type pyrite sous la forme de framboïdes (0 à 2 %). La roche contient également de fortes quantités de sels sodiques, chlorurés ou sulfatés, issus de l'eau de mer résiduelle emprisonnée au sein des sédiments lors de la diagénèse. Les carbonates sont présents sous forme de cristaux de calcite disséminés au sein de la matrice argileuse. Ils diminuent la perméabilité de la roche ( $10^{-11}$  à  $10^{-13}$  m/s). En raison d'une proportion importante de carbonates, le pH à l'équilibre dans l'eau est fortement tamponné à des valeurs proches de 9.

Tableau 1 : Composition minéralogique (%) et teneur en matière organique (g kg<sup>-1</sup>) de l'argilite du Callovo-oxfordien (COx) (d'après Scholtus, 2003)

Minéraux	Abondance (%)	Accessoires	Abondance
Quartz	41	Sidérite	n.d
Calcite	20	Gypse	n.d
Dolomite	4	Halite	traces
Mica/Illite	4,5	Feldspath	traces
Montmorillonite	11,5		
Kaolinite + Chlorite	2	Carbone Organique	6,9 g.kg <sup>-1</sup>
Hématite	1	Azote Organique	0,4 g.kg <sup>-1</sup>
Pyrite	<0.5	C/N	16,8

Néanmoins, ce pH basique est contrebalancé par une acidité latente induite par l'oxydation des petits cristaux de pyrite très réactifs, disséminés au sein de la matrice argileuse. La composition élémentaire de l'argilite utilisée dans ce travail est décrite en détails dans le Tableau 2.

Dans le cadre des expérimentations réalisées en microcosmes (Chapitre IV), les échantillons massifs de COx frais ont été concassés, broyés puis tamisés à 2 mm. Dans le cadre des expérimentations *in situ* et en conditions de laboratoire nécessitant du COx âgé, le substrat a été échantillonné lors d'une campagne de prélèvement réalisée sur la verse âgée. À la suite des prélèvements, le COx âgé a été utilisé directement.

Tableau 2: Composition élémentaire de l'argilite du COx (modifié d'après Scholtus, 2003; Belcourt, 2009)

Éléments majeurs	mmol.g <sup>-1</sup>	Éléments mineurs	µmol.g <sup>-1</sup>
Si	17,0 ± 0,2	S	260,5 ± 13,8
Al	9,7 ± 0,1	Na	49,5 ± 2,0
Ca	2,7 ± 0,1	P	8,1 ± 2,29
Fe	1,9 ± 0,5		
Mg	1,00 ± 0,02	Sr	4,93
K	0,40 ± 0,01	Mn	0,7 ± 1,9
Ti	0,00 ± 0,05	As	0,11

### 1.2 Fractionnement granulométrique de l'argilite

Afin d'étudier la réactivité des amas pyriteux et des pyrites framboïdales en présence ou non d'antioxydants, environ 2 kg de COx concassé à 3 mm a été fractionné à l'aide du protocole expérimental suivant.

Le COx concassé à 3 mm, dénommé Tout Venant (TV) a subi successivement une attrition aqueuse durant 5 minutes, et un tamisage par voie humide à 1 mm (Figure 7). Le refus du TV



à 1 mm est recyclé et subi une nouvelle attrition et un tamisage à 1 mm. Les deux fractions inférieures à 1 mm ont été mélangées et tamisées par voie sèche. La fraction granulométrique 280  $\mu\text{m}$ -1 mm a été placée à l'étuve. Le tout passant est repris par des hydrocyclones et subit un double cyclonage pour séparer les particules les plus grossières (25 -280  $\mu\text{m}$ ) des plus fines (0-25  $\mu\text{m}$ ) (Figure 8). La fraction 25-280  $\mu\text{m}$  est placée à l'étuve dans les conditions précédentes. Un deuxième cyclonage est effectué sur la fraction 0-25  $\mu\text{m}$  afin de séparer à nouveau les particules plus grossières (8-25  $\mu\text{m}$ ) des plus fines (0-8  $\mu\text{m}$ ) (Figure 8). Les 4 fractions granulométriques obtenues (> 1 mm ; 280-1mm ; 25-280  $\mu\text{m}$  ; 8-25  $\mu\text{m}$  ; <8  $\mu\text{m}$ ) sont séchées à l'étuve à 60°C durant 48 h.

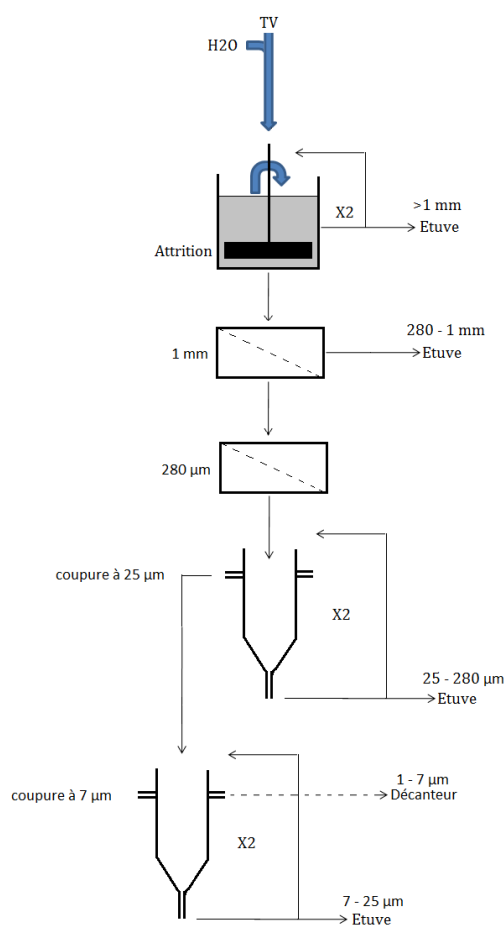


Figure 7 : Protocole de séparation granulométrique par voie humide

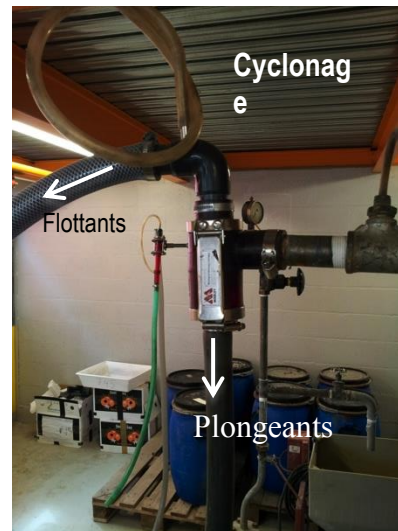
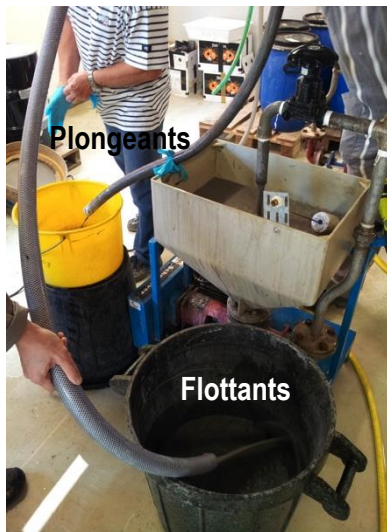


Figure 8 : Étape de cyclonage : séparation des éléments plongéants et flottants par cyclonage

### 1.3 Classification granulométrique

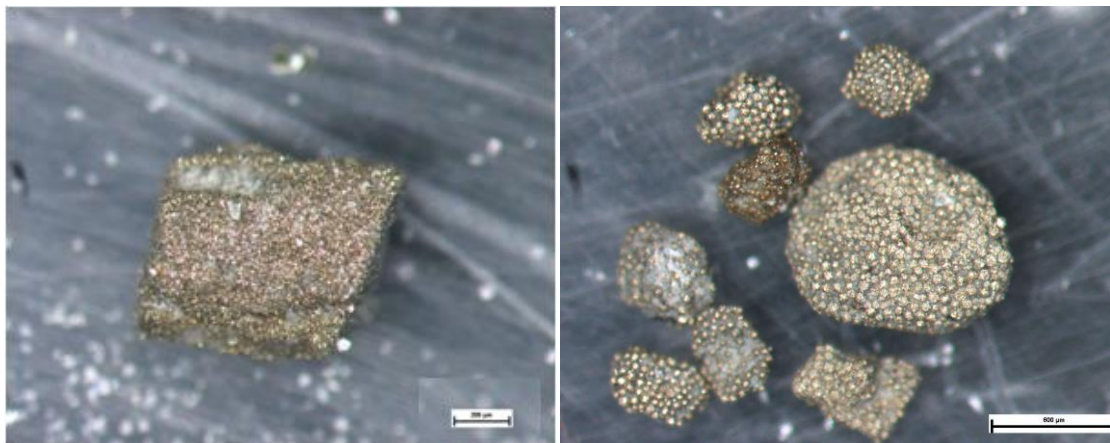
Après étuvage, une séparation granulométrique par voie sèche a été réalisée sur la fraction 20-280  $\mu\text{m}$ . Le crible a été construit avec une série de tamis possédant les tailles de maille suivantes : 210  $\mu\text{m}$ ; 125  $\mu\text{m}$ ; 100  $\mu\text{m}$ ; 80  $\mu\text{m}$ ; 63  $\mu\text{m}$ ; 50  $\mu\text{m}$ ; 20  $\mu\text{m}$ . Le Tableau 3 présente les distributions granulométriques obtenues par pesée des refus sur chaque tamis.

Tableau 3 : Bilan granulométrique de COx frais pré-broyé à 3 mm

Classes granulométriques ( $\mu\text{m}$ )	Proportion
<b>&gt; 1mm</b>	<b>0,14%</b>
<b>280 <math>\mu\text{m}</math>- 1mm</b>	<b>0,09%</b>
210 - 280	<b>0,05%</b>
125 - 210	<b>1,04%</b>
100 - 125	<b>0,58%</b>
80 - 100	<b>0,56%</b>
<b>63 - 80</b>	<b>0,75%</b>
<b>50 - 63</b>	<b>1,60%</b>
25 - 50	<b>7,06%</b>
8 - 25	<b>44,62%</b>
< 8 $\mu\text{m}$	<b>43,51%</b>

Comme l'indique le Tableau 3, plus de 85% de l'échantillon est constitué d'éléments fins de moins de 25  $\mu\text{m}$  vraisemblablement silicatés et correspondant en majorité à des particules

argileuses (feuilletés agglomérés). Les fractions grossières, au-delà de 50  $\mu\text{m}$  sont minoritaires. Les éléments pyriteux pourraient se trouver au sein des fractions lourdes des coupures granulométriques 25-50  $\mu\text{m}$ ; 50-63  $\mu\text{m}$ ; 63-80  $\mu\text{m}$ ; 80-100  $\mu\text{m}$ ; 100-125  $\mu\text{m}$  et 125-210  $\mu\text{m}$ , qui ne représentent que 11% de l'échantillon total. La spectrométrie de fluorescence X a été réalisée sur les fractions <8  $\mu\text{m}$ ; 8-25  $\mu\text{m}$ ; 50-63  $\mu\text{m}$  flottants à l'issue de la densimétrie; 50-63  $\mu\text{m}$  et 100-210  $\mu\text{m}$ . Des spectres similaires ont été obtenus pour les 5 échantillons avec des raies spécifiques au calcium et au fer. Des essais de spectrométrie Raman ont également été entrepris sur les fractions 50-63  $\mu\text{m}$  ; 50-63  $\mu\text{m}$  plongeants lors de la densimétrie ; et sur des pyrites framboïdales isolées de la fraction 280-1000  $\mu\text{m}$  (Figure 9). La présence des bandes de diffusion à 530  $\text{cm}^{-1}$ , 360  $\text{cm}^{-1}$  et 1080-1092  $\text{cm}^{-1}$  indiquerait la présence de phosphates, d'oxydes et carbonates respectivement. Des analyses chimiques (spectrométrie de fluorescence X, spectrométrie Raman, DRX) plus poussées pourraient être réalisées afin de déterminer la composition de toutes les fractions granulométriques afin d'isoler celles qui contiennent les pyrites à extraire et concentrer.



*Figure 9: Pyrites framboïdales isolées de la fraction 280-1000  $\mu\text{m}$  de COx pré-broyé à 3 mm et ayant subi une séparation granulométrique par voie humide et sèche*

Une séparation densimétrique par liqueur dense a été effectuée pour séparer les éléments flottants silicatés des éléments plongeants vraisemblablement pyriteux. Les densimétries réalisées par centrifugation (20 minutes) ont été opérées sur les fractions 20-50  $\mu\text{m}$  et 50-63  $\mu\text{m}$  à l'aide de bromoforme.

#### 1.4 Enrichissement artificiel de l'argilite en sulfures (pyrite)

Afin de mieux visualiser l'oxydation des sulfures au sein du COx, un lot d'argilite a été enrichi avec des grains de pyrite finement broyée (< 20 $\mu\text{m}$ ) (Chapitre IV-2). La pyrite

provient d'un gisement carbonaté, associé à des événements volcano-sédimentaires d'Espagne (Logroño). À l'état brut, les cristaux de pyrite se présentent sous la forme de petits cubes individuels tronqués, parfois entourés d'un résidu de gangue carbonatée. Sa pureté est voisine de 99,5 %. Cette pyrite a été choisie car elle contient un faible pourcentage d'arsenic (0,3 %) réparti de façon homogène dans la matrice cristalline. ( $< 5 \mu\text{g g}^{-1}$  COx moyenne).

Après quartage, la moitié du lot de COx « frais » (1,65 kg) a été dopée en pyrites. Le dopage en pyrites finement broyées (84 g) augmente le taux de sulfures dans le COx de 1 à 3,33 % w/w. L'abondance naturelle.

Les grains de pyrite broyée ont été lavés dans une solution d'acide sulfurique à 10 % afin d'ôter des grains la couche de sulfates et oxydes formés durant le broyage et le stockage. Les pulpes de pyrite broyée ( $200 \text{ g.l}^{-1}$ ) ont été mises sous agitation durant une heure puis mises à décantation. Le lot de pyrite lavé a été stérilisé par autoclave en présence d'une solution d'acide sulfurique à 1 %. Après décantation, les grains de pyrite ont été rincés à l'eau osmosée stérile et séchés durant 24 h à l'étuve à température modérée ( $70^\circ\text{C}$ ) afin d'éviter toute ré-oxydation avant ajout et mélange COx.

## **2 Extraction et production de l'inoculum bactérien**

L'ensemencement microbien de l'argilite dans les dispositifs avec ajout exsudats racinaires synthétiques (Chapitre IV-2) a été réalisé à l'aide d'un extrait de terre végétale disponible sur le CMHM (URL). La terre végétale choisie était entreposée depuis 10 ans au droit des versées et correspondait à la terre arable arasée mécaniquement lors de la mise en place des premières versées d'argilite. Le protocole d'extraction de l'inoculum bactérien est conforme à celui décrit par Joner & Leyval (2003). 200 g de terre végétale ont été humidifiés à 30 % de la capacité au champ et placés à  $28^\circ\text{C}$  durant 48 h afin de favoriser le développement des bactéries autochtones. Un litre d'eau osmosée stérile est ajouté à la terre végétale afin de la déliter au sein d'un mixeur stérile durant 1 min. Le surnageant est récupéré après décantation et centrifugé à 1000 g durant 2 min pour « culoter » (séparer) les particules fines de terre et récupérer les bactéries en suspension. Une seconde centrifugation à 10000 g durant 10 minutes sert à récupérer le culot bactérien. Enfin, le culot est dispersé dans une solution d'exsudats racinaires synthétiques (1 litre) qui sert ensuite à ensemencer les dispositifs expérimentaux (colonnes « filtrantes » décrites au § 6). La densité bactérienne de la solution d'ensemencement est évaluée par NPP (§ 8.1).

### 3 Plantes utilisées

Le choix des plantes utilisées dans cette étude s'est orienté vers :

- (i) La luzerne (*Medicago sativa* var. Europe) et le ray-grass (*Lolium multiflorum* var. Podium), pour des essais préliminaires de croissance sur l'argilite (Chapitre III), car ce sont des espèces modèles de laboratoire dont les fonctionnements écophysologiques sont connus (temps de germination courts, pratiques culturales simplifiées)
- (ii) La lavande officinale ou lavande vraie (*Lavandula angustifolia* Miller), le lavandin (*Lavandula x intermedia* « grosso ») et le thym (*Thymus serpyllum*), pour leur capacité à produire de molécules anti-oxydantes (essences aromatiques). Ces plantes, connues et cultivées depuis des siècles pour des applications dans le domaine médical et dans la parfumerie, ont été retenues dans le chapitre III de cette étude, pour leur intérêt potentiel pour la végétalisation des vers. La lavande et le lavandin ont finalement été retenus dans les essais de végétalisation des verses d'argilite.

### 4 Antioxydants employés

Trois antioxydants ont été utilisés au cours de ce travail : le linalol, le carvacrol et le thymol. Leurs propriétés physico-chimiques (solubilité, propriétés antioxydantes, utilisation, ...) et antiseptiques (antibactérien, antifongiques, ...) sont connues. Leur choix a priori a été guidé par leurs propriétés antioxydantes ainsi que leur présence probable dans les substrats végétalisés par des plantes rustiques. Le chapitre III décrit, en détail, les recherches réalisées sur ces composés ainsi que les critères établis pour leur sélection.

#### 4.1 Linalol

Le linalol a été fourni par la compagnie Sigma (référence : 1721488). Sa pureté est de 97 %. C'est un alcool terpénique de formule chimique  $C_{10}H_{18}O$  ( $M = 154,25 \text{ g.mol}^{-1}$ ), dont la nomenclature est 3,7-diméthyl-octa-1,6-diène-3-ol. Il se présente sous la forme d'un liquide incolore. Il est naturellement synthétisé par la lavande sous forme d'huile essentielle. Sa structure est représentée dans la Figure 10. Ce composé a été retenu pour les expériences en conditions contrôlées de laboratoire pour son faible coût, sa facilité d'utilisation, ainsi que pour ses propriétés antibactériennes et antioxydantes (Scortichini & Rossi, 1991; Ložienė & Venskutonis, 2005). Sa solubilité dans l'eau est supérieure à  $1,5 \text{ g.l}^{-1}$ .

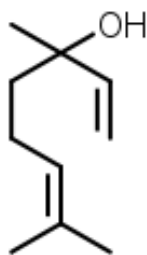


Figure 10: Structure moléculaire du linalol

#### 4.2 Thymol

Le thymol a été fourni par la compagnie Sigma (référence : 16254). Sa pureté est supérieure à 99 %. C'est un composé phénolique de formule chimique  $C_{10}H_{14}O$  ( $M = 150,22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), dont la nomenclature est 5-méthyl-2-isopropyl-1-phénol. C'est un dérivé du crésol dont le produit commercialisé, se présente sous la forme de cristaux incolores. Il est naturellement synthétisé par le thym, et est présent sous forme d'huile essentielle. Sa structure est représentée dans la Figure 11. Cette molécule a été choisie pour son faible coût, sa facilité de manipulation et sa faible toxicité. Elle est également connue pour ses effets inhibiteurs sur l'oxydation des pyrites (Meline et al. 1996) et antibactériens (Berthelin et Belgy 1979). C'est une molécule anti-oxydante de référence, qui présente cependant une faible solubilité dans l'eau, de l'ordre de  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

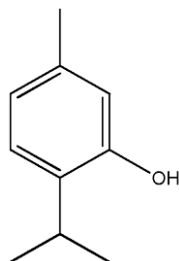


Figure 11: Structure moléculaire du thymol

#### 4.3 Carvacrol

Le carvacrol a été fourni par la compagnie Sigma (référence : W224502). Sa pureté est supérieure à 98 %. C'est un composé phénolique monoterpénoïde de formule chimique  $C_{10}H_{14}O$  ( $M = 150,22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), dont la nomenclature est 2-méthyl-5-isopropyl-1-phénol. Il se présente sous la forme d'un liquide incolore. Il est naturellement synthétisé par le thym sous forme d'huile essentielle. Sa structure chimique est représentée dans la Figure 12. Ce composé a été choisi pour sa facilité de manipulation, et son absence de toxicité. De plus, cette molécule est isomère du thymol. Il est également connu pour ses effets antioxydant plus

important que les autres molécules sélectionnées (Lee et al., 2005) et ses propriétés antibactériennes (Srivastava et al. 1999). Sa solubilité dans l'eau est supérieure à 1,2 g.l<sup>-1</sup>

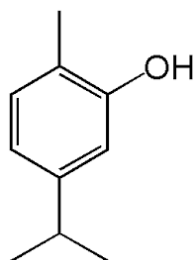


Figure 12: Structure moléculaire du carvacrol

## 5 Les solutions d'exsudats racinaires synthétiques

Une solution d'exsudats synthétiques a été utilisée afin de simuler l'effet stimulant de la rhizosphère des plantes dans des dispositifs en microcosmes. Sa composition est la suivante : 20 mM de fructose, 20 mM de glucose, 20 mM de saccharose, 10 mM d'acide succinique, 10 mM d'acide malique, 5 mM d'arginine, 5 mM de sérine et 5 mM de cystéine (Griffiths et al., 1998; Joner et al., 2002). Elle est utilisée comme source de carbone afin de favoriser le développement des bactéries sur le CO<sub>x</sub>.

Pour le besoin des expériences (Chapitre IV-2), des solutions d'antioxydants ont été ajoutées à la solution mère d'exsudats synthétiques, pour des teneurs en linalol, thymol et carvacrol s'échelonnant de 0,2 à 20 mg.l<sup>-1</sup>. Les solutions ont été filtrées à 0,2 µm afin de les stériliser.

## 6 Expériences en microcosme

### 6.1 Dispositifs de germination (composition et préparation)

Des essais de germination et des suivis de développement racinaire ont été réalisés en conditions contrôlées (16°C nuit/23 °C jour, hygrométrie de 40%, photopériode de 16h, 260 µmol de photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) avec deux plantes modèles de laboratoire, la luzerne et le ray-grass, et une plante d'intérêt potentiel pour la végétalisation, le thym, afin de visualiser le système racinaire et les formations minérales primaires et secondaires. Des piluliers de diamètre 35 mm dont le fond a été percé de 10 trous ont été utilisés et remplis avec du CO<sub>x</sub> frais préalablement délité dans l'eau et mélangé pour moitié avec du sable de Fontainebleau.

Pour évaluer le pouvoir germinatif de la lavande sur le CO<sub>x</sub>, des dispositifs similaires en pilulier ont été remplis à leur base d'une couche drainante de sable de Fontainebleau et dans leur partie supérieure de CO<sub>x</sub> frais ou âgé.

Des graines de *Lavandula angustifolia*, ont été vernalisées à 4°C durant 1 mois puis prétraitées à l'acide gibbérellique à 100 mg.l<sup>-1</sup> ; 200 mg.l<sup>-1</sup> et 300 mg.l<sup>-1</sup> : après mise en place au sein d'un papier Whatman©, la poche contenant les graines est placée durant 1 min au sein de la solution d'acide gibbérellique. Après imbibition, la poche est placée hermétiquement dans un sachet durant 48h. Après semis, les microcosmes ont été placés mis à l'obscurité durant 48h. Chaque dispositif sur COx frais ou âgé a été placé en phytotron et irrigué quotidiennement de solution de Hewitt (Hudson, 1967). Des dispositifs témoins ont été réalisés avec des graines de lavandes vernalisées et sans prétraitement hormonal. Des témoins de germination ont été réalisés avec des graines de lavandes vernalisées au dans des dispositifs sans COx contenant un papier filtre préalablement imbibé d'eau osmosée, d'acide gibbérellique à 100 mg.l<sup>-1</sup> ou 300 mg.l<sup>-1</sup>.

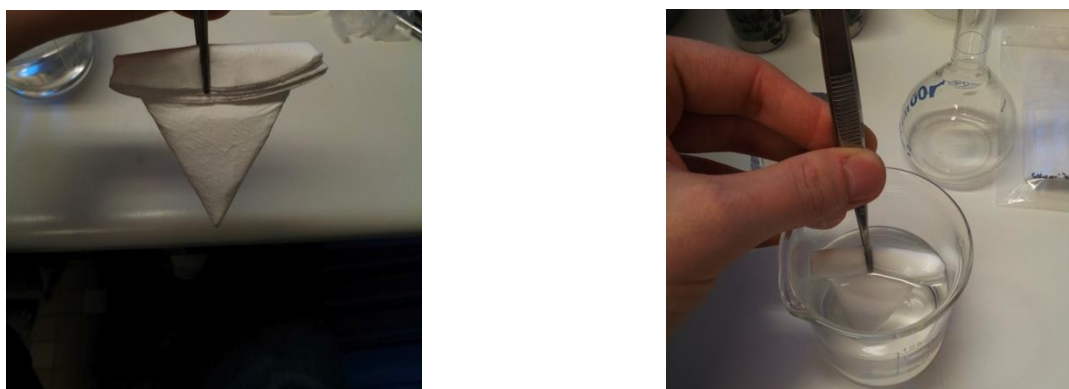


Figure 13: Graines de *Lavandula angustifolia* avant traitement (a) et durant le traitement à l'acide gibbérellique à 300 mg.l<sup>-1</sup> (b)

## 6.2 Dispositif en colonnes « filtrantes »

Les dispositifs expérimentaux, utilisés lors des deux expérimentations au laboratoire, sont composés de deux parties distinctes. La partie supérieure est composée d'une colonne de filtration stérile à 0,45 µm en Nalgene® de 150 ml (référence 734-5064, VWR) commune aux deux expérimentations. Pour la première expérimentation, un pré-filtre en fibre de verre à 1,5 µm a été utilisé afin de prévenir le colmatage de la filtration intégrée à la colonne en Nalgene®, mais n'a pas été réitéré pour la deuxième expérimentation. La partie inférieure est un flacon Schott® stérile de 150 ml destiné à la collecte des lixiviats. Pour la deuxième expérimentation, il s'agit d'un contenant en Nalgene® vendu stérile avec la colonne de lixiviation (référence 513-1552, VWR).

Dans la première expérimentation réalisée en chambre de culture à 18°C nuit/23°C jour, hygrométrie de 40%, photopériode de 16h avec 260 µmol de photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, trois



antioxydants à trois concentrations différentes ont été ajoutés en solution dans les colonnes, avec un témoin sans antioxydant, avec trois réplicats, soit un total de 30 dispositifs expérimentaux. Dans cette expérience, réalisée avec 10 g de COx dans les colonnes, 200 ml d'une solution d'un des trois antioxydants, le linalol, le carvacrol ou le thymol, à 0, 2, 40 ou 80 mg.l<sup>-1</sup> ont été ajoutés. Tous les 7 jours, les colonnes remplies de COx ont été imbibées et saturées avec une solution d'eau osmosée afin de récupérer périodiquement les lixiviats.

Dans la deuxième expérience réalisée en chambre thermostatée à 28°C pour favoriser la croissance microbienne, les colonnes de filtration ont reçu 30 g de COx enrichi ou non en pyrites (1g) et deux antioxydants, le thymol et le linalol, à trois concentrations, 0,2 ; 2 et 20 mg.l<sup>-1</sup> ont été testés, avec un témoin sans antioxydant, avec quatre répétitions par modalité. Par ailleurs, les colonnes ont reçu ou non initialement 15 ml d'une suspension bactérienne dans une solution d'exsudats racinaires. Les colonnes avec inoculum bactérien ont été inoculées de manière à ajouter 10<sup>7</sup> bactéries g<sup>-1</sup> COx. Tous les 7 jours, les colonnes remplies de COx ont été imbibées et saturées avec de l'eau osmosée stérile ou des exsudats racinaires stériles avec ou sans antioxydants en fonction des modalités des colonnes afin de récupérer périodiquement les lixiviats.

Hebdomadairement, les lixiviats filtrés à 0,45 µm sont récupérés pour effectuer des analyses physico-chimiques par ICP et chromatographie ionique (§ 10.1 et 10.2), ainsi que des mesures de pH. Aux termes des temps finaux d'expérimentation, le COx a été prélevé. Cependant, aucune analyse supplémentaire n'a pu être réalisée pour la première expérimentation pour cause de délitement du pré-filtre dans le COx. Des numérations microbiennes (§ 8.1.1) ont été réalisées sur le COx de la deuxième expérimentation.

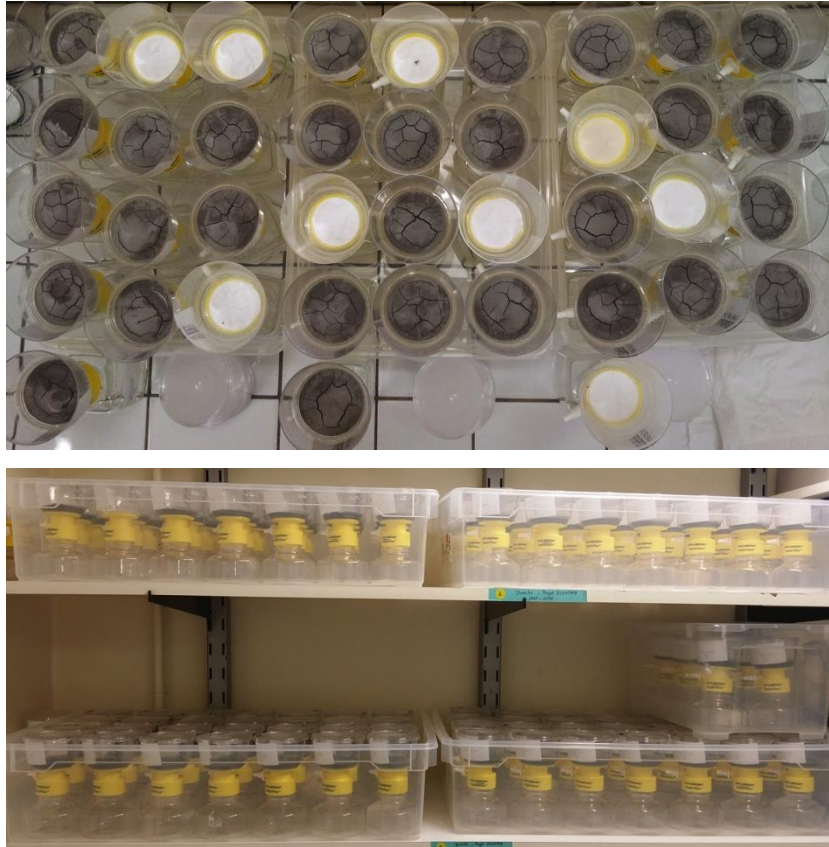


Figure 14: Dispositifs en colonnes « filtrantes » de l'expérience avec antioxydants (a) et avec composés foliaires et racinaires (b) en conditions contrôlées

## 7 Essais de végétalisation *in situ*

### 7.1 Contraintes climatiques

Le climat de Bure est océanique à tendance continentale. Ainsi, les plantes doivent présenter une bonne résistance, à la fois à la sécheresse estivale accompagnée de températures élevées (en moyenne de 19 à 24°C en juillet), ainsi qu'aux températures basses et à l'enneigement des mois d'hiver (en moyenne de 0 à 2,5°C en janvier). La température moyenne annuelle est de 10°C, avec un taux de précipitations moyennes annuelles compris entre 700 et 1000 mm an<sup>-1</sup>.

### 7.2 Contraintes édaphiques

Sur les versées, les plantes sont également exposées à de multiples contraintes physiques et climatiques notamment à de fortes variabilités d'humidité du substrat, tel qu'un gradient décroissant du haut au bas de la pente de la versée. Une croûte indurée tend à se former en surface lors du vieillissement du substrat exposé à l'air libre, limitant le drainage en profondeur. De plus, cette phase solidifiée de surface est plus sensible à l'érosion et pourrait de ce fait, annihiler la germination par recouvrement du semis ou par entraînement en bas de

la pente de la verse. De même, l'aspect massif de l'argilite fraîchement excavée peut nécessiter un concassage pour le semis et la bonne implantation des végétaux.

En ce qui concerne les contraintes chimiques, c'est un substrat essentiellement composé de minéraux, pauvre en matière organique et qui a une forte charge saline ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,...) (Tableau 2). Ainsi, les plantes doivent nécessiter de faibles besoins nutritifs et pouvoir résister à la salinité élevée du substrat. Les importantes teneurs en carbonates de types calcite ou dolomite (Tableau 1) ont pour effet de tamponner le pH à des valeurs proches de 8,7 (Scholtus, 2003; Muller, 2012). Dans ce milieu basique, la solubilité des éléments nutritifs nécessaires à la plante est très faible. Par ailleurs, des symptômes de carences nutritives, de toxicité et de stress hydrique, certainement dus à la forte teneur en sels, ont été observés par Scholtus (2003) chez le lotier et la fétuque.

### 7.3 Mise en place de l'essai de végétalisation

La verse ancienne du CMHM, constituée d'argilite stockée à l'air libre depuis plus de 10 ans, a été choisie pour effectuer des premiers essais de végétalisation sur une période de 276 jours, de Juillet 2013 à Mai 2014. Des plants de lavandes germés au laboratoire, en utilisant un protocole de levée de dormance avec de l'acide gibbérellique à  $200 \text{ mg.l}^{-1}$ , ou des lavandins issus de bouturage de pépinières ont été installés sur les pentes et la table de la verse ancienne. Deux parcelles de  $4 \times 4 \text{ m}^2$  exposées respectivement au Sud et à l'Est ont été terrassées à la main afin d'ôter la couche de COx oxydée située en surface et d'obtenir des tables ( $2 \times 4 \text{ m}^2$ ) et des pentes de 2:1, soit un dénivelé de 50%, identiques pour les deux expositions (Figure 9). Un chemin en caillebotis amovibles sert de passage pour l'arrosage, les mesures et prélèvements.



Figure 15 : Dispositif d'essai de végétalisation de lavande sur verse âgée à l'Est (à gauche) et au Sud avec accès protégé et une allée recouverte de caillebotis escamotables (à droite) 62 jours après plantation

Cinq modalités de plantation, soit de lavandes ou de lavandins, ont été réalisées afin de sélectionner les pratiques culturales et les espèces les plus adaptées (Figure 16). 54 plantes ont

ainsi été plantées sur la verse, espacées de 60 cm : lavande germée sur COx; lavande ou lavandin germés sur terreau avec ajout de terreau lors de la plantation ; lavande ou lavandin germés sur terreau dont les racines ont été rincées pour retirer le terreau avant la plantation. L'arrosage a été effectué régulièrement par des personnels de l'Andra en fonction des conditions météorologiques. Des mesures de hauteurs et de diamètres des plants ont été réalisées et les plantes ont été photographiées tous les quinze jours pour suivre leur développement.



Figure 16 : Modalités de préparation et de plantation des lavandes et lavandins implantés sur verse âgée à l'Est et au Sud. (a) lavande germée sur COx ; (b) lavande germée sur terreau avec ajout de terreau lors de la plantation ; (c) lavande germée sur terreau dont les racines ont été rincées pour retirer le terreau ; (d) lavandin avec ajout de terreau lors de la plantation ; (e) lavandin dont les racines ont été rincées pour retirer le terreau.

#### 7.4 Mise en place d'une verse végétalisée

Un second dispositif de parcelles (4 x 7 m<sup>2</sup>) a été installé sur la verse ancienne avec une exposition Sud. Il comprend une parcelle plantée et une parcelle nue. Les deux parcelles ont été préalablement terrassées et nivelées mécaniquement (mini-pelle), afin d'ôter la couche de COx oxydée de surface et d'obtenir des tables quasi-planes et des pentes régulières (2:1). Dans ce dispositif plus important, 200 pieds de lavandins issus de pépinières *Lavandula x intermedia* « grosso » ont été implantés sur une des parcelles : i.e. 100 pieds sur la table et 100 sur la pente. Les surfaces plantées sur la table et la pente sont identiques, soit 14 m<sup>2</sup>, ce qui correspond à une densité de plantation de 7,1 plants/m<sup>2</sup> de parcelle, (Figure 17). Une disposition de plantation en quinconce a été sélectionnée afin d'obtenir une couverture végétale maximale de l'argilite. Une parcelle similaire, sans plante, a été réalisée en tant que témoin. Pour chaque parcelle, un système de récupération des eaux de ruissellement a été

installé en bas de pente avec une gouttière. Cette gouttière en PVC équipée d'un drain en géotextile (Bidime) et d'une crapaudine collecte les eaux de surface et les dirige vers un bidon en PET de 30 litres. Un système de collecte des eaux de pluie avec une géométrie similaire (gouttière) est aussi implanté sur la table. Une station météorologique installée non loin des versées assure le suivi pluviométrique journalier sur site. L'évolution des parcelles a été suivie pendant presque un an (351 jours) du 06 Juin 2014 au 22 Mai 2015, par l'analyse des eaux de ruissellement et au bout d'un an par l'évolution physico-chimique et microbiologique de l'argilite en présence et en absence de plantes (Figure 17).

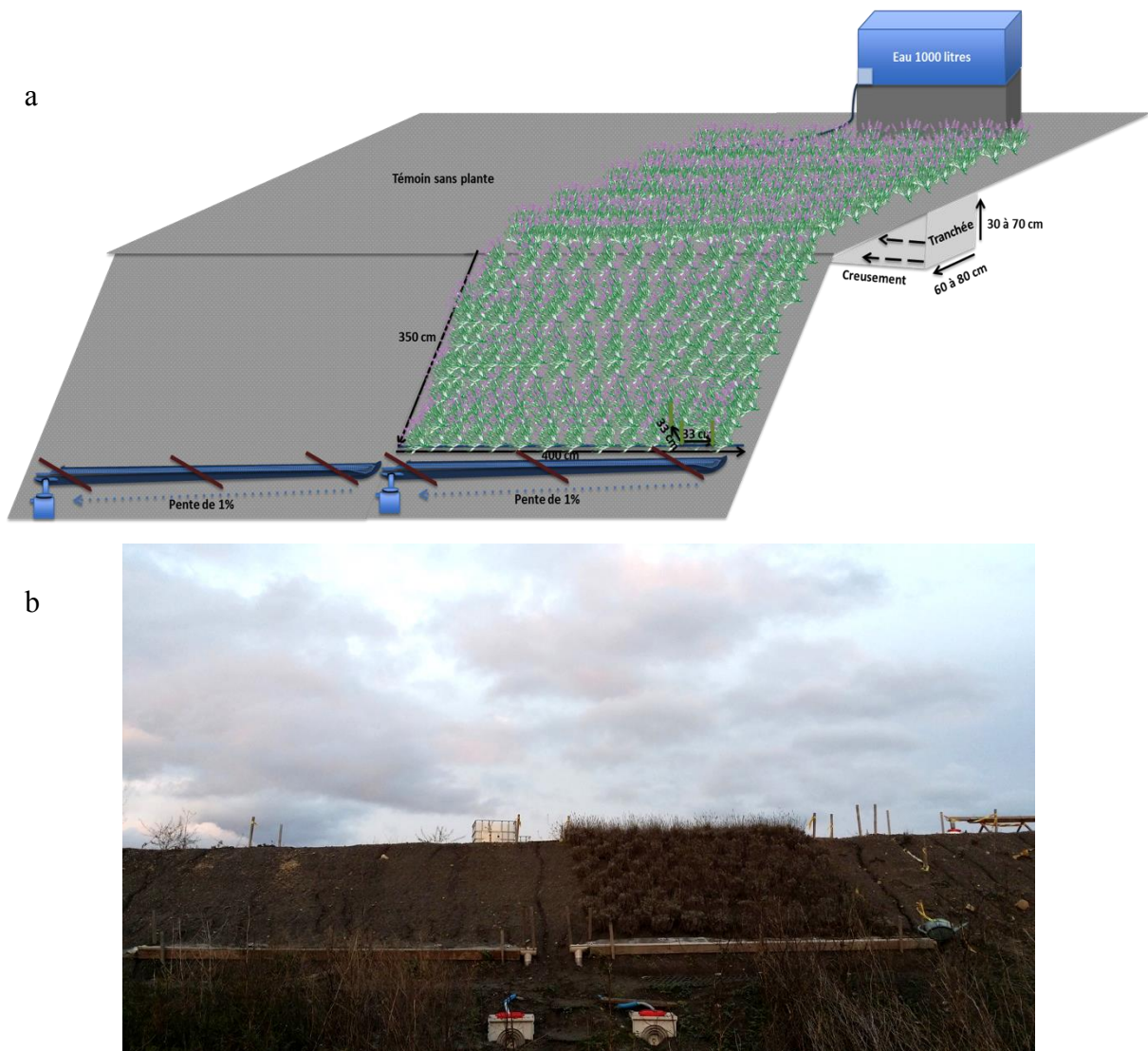


Figure 17: Schéma (a) et dispositif (b) in situ de végétalisation sur versée âgée et témoin non planté, au Sud, avec dispositif de récupération des eaux de ruissellement en bas de pente. Sur la table (en haut à droite), le système de récupération des eaux de pluie avec une gouttière.  $T = 6$  mois après plantation.

## 7.5 Échantillonnage dans les essais *in situ*

Durant le fonctionnement des parcelles aménagées, des prélèvements d'argilite avec un minimum de 3 répétitions en Mai 2014 (§7) à 5 répétitions en Mai 2015 (§ 7.4) ont été réalisés en surface (P1), à 5 cm (P2), à 15 cm (P3) et à 30 cm de profondeur (P4) au droit des pieds de lavandes ou lavandins afin d'effectuer des analyses physico-chimiques et microbiologiques (Figure 18). Des prélèvements similaires ont été réalisés dans les parcelles sans plantes.

Les échantillons de COx ou de biomasse végétale fraîche prélevés sont stockés dans l'attente d'analyses ultérieures. Pour limiter les risques de dégradation, les échantillons destinés aux analyses microbiologiques sont congelés (-20°C). Pour stabiliser l'altération du COx, pour les analyses minéralogiques ou limiter le flétrissement des végétaux pour le dosage des composés antioxydants, une conservation à 4°C a été réalisée.

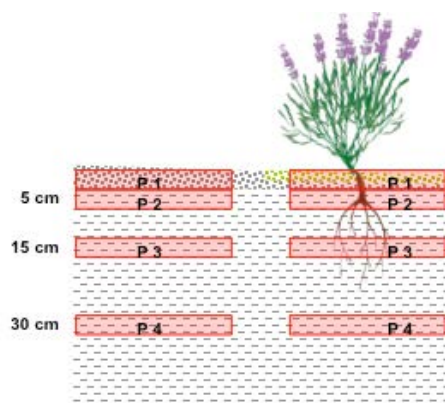


Figure 18 : Schéma de prélèvements de l'essai de végétalisation des versées en surface (P1), à 5 cm de profondeur (P2), à 15 cm de profondeur (P3) et à 30 cm de profondeur (P4)

## 8 Analyses biologiques

### 8.1 Détection et numération des microorganismes

Des analyses microbiologiques ont été réalisées sur les échantillons d'argilite plantés et non plantés.

#### 8.1.1 Extraction d'ADN et Quantification du nombre de copies par q-PCR

L'ADN ribosomique fongique et bactérien de l'expérimentation *in situ* et en conditions de laboratoire a été extrait à l'aide du kit d'extraction FastDNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) selon la méthode décrite par le fournisseur, avec un volume final d'élution de 80 µl pour 0,5 g de COx. Une quantification sélective de l'ADN bactérien 16S et fongique 18S, avec les couples d'amorces 968F et 1401R et Fung5F et FF390R respectivement, a été

réalisée par q-PCR (Cebon et al., 2011) (Tableau 4). Les réactions d'amplification (20 µl de volume final) ont été effectuées en utilisant 10 µl de iQ SYBR SuperMix verte (Bio-Rad), 0,8 µl de chaque amorce (10 µM), 0,4 µl de BSA à 3% (sérum albumine bovine) en solution, 0,2 µl de DMSO (diméthylsulfoxyde), 0,08 µl de protéine gp 32 du bactériophage T4 (MP Biomedicals, France) et 1 µl d'ADN dilué, ce qui correspond à 7,8 à 3,1 ng. Les conditions de PCR étaient les suivantes: 95 ° C pendant 5 min, 40 cycles de 95 ° C pendant 30 secondes, 54 ° C pendant 30 secondes et 72 ° C pendant 30 secondes et une étape d'extension finale à 72 ° C pendant 7 min. Les qPCR ont été réalisées avec des échantillons d'ADN dilués au tiers à l'aide d'un thermocycleur en temps réel CFX96 (Biorad) et les conditions suivantes : à partir de 51 ° C à 95 ° C, augmentation de 0,5 ° C toutes les 10 secondes, acquisition de la fluorescence (Cébron et al 2008; Thion et al., 2012). Les données ont été exprimées en nombre de copies de gène d'ADNr 16S et 18S g<sup>-1</sup>.

Tableau 4 : Amorces, températures d'hybridation (TH), nombre de cycles (C) et tailles attendues des fragments (TF) de la PCR

Cible	Amorces	Séquences 5'→3'	TH (°C)	C	TF (pb)	Références
ADNr 16S	968F 1401R	GAACGCAAGAACCTTAC CGGTGTGTACAAGACCC	56	35	430	(Felske et al., 1998)
ADNr 18S	Fung5F FF390R	GGGAACCAGGACTTTTAC GAGGTCTGTTTCGTTATCG	50	35	550	(Lueders et al., 2004)

#### 8.1.2 Dénombrement des bactéries cultivables par NPP

Un dénombrement des bactéries hétérotrophes cultivables a été réalisée par la technique du Nombre le Plus Probable (NPP). Cette méthode définit les bactéries cultivables par leur capacité à se développer dans un milieu de culture riche de type LB (Luria-Bertani). Sur ces tests réalisés en microplaques, leur croissance est révélée par une variation de la densité optique (trouble opalescent) mesurée à 620nm par un spectrophotomètre. L'échantillon de COx à analyser est délité dans de l'eau osmosée sous agitation pendant une heure. La suspension à 1% (1g pour 100 ml) est ensuite diluée en cascade plusieurs fois (série de dilution au dixième). Chaque dilution sert ensuite à ensemercer une série de puits (24) d'une microplaque contenant le milieu LB. Après une période d'incubation optimale de 24 à 72 h à 28°C ± 0.5°C, les mesures photométriques à 600 nm sont réalisées dans chaque puits. Les puits présentant une variation positive de densité optique supérieure à 0.1 unité par rapport au blanc (milieu seul non ensemençé) sont considérés comme positifs. Le Nombre le Plus Probable (NPP) est ensuite estimé par calcul à partir du nombre de puits positifs par dilution

avec l'aide d'un programme dédié (MPN calculator, Version 4.04, USA EPA). L'estimation statistique restitue la densité moyenne des bactéries dans l'échantillon (bact/ml ou bact/g). Des intervalles de confiance (à 95%) sont associés à cette estimation moyenne de la densité bactérienne dans l'échantillon.

## 8.2 Estimation des paramètres mycorhiziens des racines de lavandins

L'estimation du taux de mycorhization de racines de lavandins prélevées *in situ* (verses) ou en conditions contrôlées de laboratoire (microcosmes en pots) a été réalisée par l'observation au microscope en fond clair et à faible grossissement de fragments de racines préalablement colorées au bleu Trypan pour déceler la présence de mycélium. La proportion de cortex racinaire colonisé par les champignons mycorhiziens est estimée par la méthode de Trouvelot et al (1986). Elle est basée un système de notation pour estimer la colonisation par le champignon (6 classes) ainsi que la présence d'arbuscules (4 classes).

### 8.2.1 Coloration des racines

La coloration au bleu Trypan des racines est réalisée selon le protocole de Koske et Gemma (1989). Des fragments d'un centimètre de racines fraîches, pris au hasard, ont été préalablement lavés à l'eau puis laissés pendant 12 heures dans une solution d'éthanol à 50 %. Les racines ont été ensuite rincées puis décolorées dans une solution de potasse à 5 %. Après 4-5 rinçages, les fragments racinaires ont été placés pendant 12 heures dans une solution d'acide chlorhydrique à 1 % puis ont été mis dans une solution de bleu Trypan à 0,5 % (0,5g de bleu Trypan, 50 ml HCl à 1 %, 500 ml de glycérol à 98 % et 450 ml d'eau) afin de les colorer. Après une demi-journée, les racines sont rincées puis placées dans une solution de décoloration (50 ml d'HCl à 1 %, 500 ml de glycérol à 98 % et 450 ml d'eau) jusqu'à la préparation des lames. Chaque étape de rinçage a été réalisée à l'aide d'eau distillée. Les racines colorées sont placées entre lames et lamelles, avec du glycérol, afin de permettre l'observation sous microscope optique. Trente fragments racinaires ont été préparés pour chaque échantillon, à hauteur de 10 fragments par lame.

### 8.2.2 Paramètres d'estimation

Fréquence de la mycorhization F :

$$F\% = 100 \times \left( \frac{N-n_0}{N} \right)$$

N = nombre de fragments observés

$n_0$  = nombre de fragments non mycorhizés



Intensité de mycorhization du cortex, M :

$$M\% = \frac{95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1}{N} \quad N = \text{nombre de fragments observés}$$

$n_5 - n_1$  = nombre de fragments notés 5 à 1

Teneur en arbuscules de la partie mycorhizée, a :

$$a\% = \frac{100mA_3 + 50mA_2 + 10mA_1}{100}$$

$$mA = (95n_5A + 70n_4A + 30n_3A + 5n_2A + n_1A) \times \frac{F}{M \times (N - n_0)}$$

$mA_3$  à  $mA_1$  = % de fragments mycorhizés, m, affectés par les notes A3 à A1

Teneur en arbuscules du système racinaire, A :

$$A\% = a \times \frac{M}{100} \quad M = \text{intensité de mycorhization du cortex}$$

A = teneur en arbuscules de la partie mycorhizée

### 8.3 Croissance et physiologie des plantes

A la récolte, les racines et les tiges des lavandes et lavandins plantés sur COx sont séparées et lavées à l'eau distillée. Les biomasses fraîches et sèches des parties aériennes et racinaires ont été mesurées.

#### 8.3.1 Humidité pondérale

L'humidité pondérale (HP en %) des parties aériennes et racinaires ont été déterminées par différence des masses avant et après séchage en étuve à 60°C durant 72h. La teneur en eau des tissus a pu être calculée selon la formule suivante :

$$HP = \frac{BF - BS}{BF} \times 100$$

où BF est la biomasse fraîche (en g) et BS et la biomasse sèche (en g)

Le rapport de la biomasse racinaire sèche par la biomasse foliaire sèche (BR/BA) a été déterminé à la suite d'un séchage en étuve à 60°C durant 72h des parties aériennes et racinaires.

#### 8.3.2 Caractéristiques morphométriques du système foliaire

Les croissances des lavandes et lavandins ont été mesurées toutes les deux semaines à l'aide de deux paramètres morphométriques non destructifs : diamètre et hauteur. De manière concomitante à ces mesures, des photographies de chaque plante ont été prises afin d'apprécier la couleur du feuillage, d'estimer leur surface foliaire et d'observer leurs évolutions respectives.

## **9 Détection et dosage semi-quantitatif des antioxydants**

L'extraction des antioxydants et molécules aromatiques volatils des parties aériennes et/ou racinaires des lavandins et d'échantillons solides de COx a été réalisée par micro-extraction sur phase solide (SPME 100  $\mu\text{m}$  PDMS, Ref 57300-U, Sigma-aldrich) par Lexva-analytique (Saint-Beauzie, France). Le principe de micro-extraction sur phase solide (SPME) consiste en l'adsorption et la mise à l'équilibre des composés volatils d'intérêt sur une phase polymérique intégrée dans une fibre en silice. L'unité SPME est ainsi formée de deux parties. La première partie est constituée d'une fibre en silice fondue enrobée d'un polymère protégé par une aiguille creuse. La deuxième partie est constituée d'un piston en acier. La fibre est ensuite fixée au piston en acier. L'aiguille sert à percer l'opercule du flacon avec l'échantillon. L'adsorption des composés sur la fibre SPME a été réalisée en mode « head space », i.e. la fibre est déployée et placée dans la phase gazeuse au-dessus de l'échantillon durant 20 minutes afin d'adsorber les substances volatiles d'intérêt. Les composés concentrés sur la fibre SPME sont ensuite désorbés par voie thermique (250°C) dans l'injecteur d'une chromatographie en phase gazeuse (GC) Agilent 7890A couplée à un spectromètre de masse (MS) Agilent 5975C. L'identification des pics du spectre de masses est réalisée en se référant McLafferty & Stauffer, (1989) et Adams (2007).

Cette approche semi-quantitative inventorie l'ensemble des composés présents dans les parties aériennes ou racinaires des plantes ou les échantillons de COx et estime leur abondance relative.



Figure 19: Dispositif de la micro-extraction sur phase solide en place avec un échantillon foliaire de lavandin

## 10 Analyses physico-chimiques des lixiviats

Après chaque prélèvement et avant toute analyse des cations ou d'anions, l'acidité (pH) des lixiviats est mesurée.

### 10.1 Analyse élémentaire par ICP

Les solutions sont analysées pour les éléments totaux en spectrométrie d'émission ICP- AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, Varian 720 ES), en utilisant un standard interne à base d'yttrium.

La solution acide d'Yttrium (Y-HCl à 1%) est ajoutée pour moitié aux prélèvements, afin d'obtenir, après dilution, une matrice globale à 1 ppm d'Yttrium. Cet ajout dosé favorise la dissociation des complexes métalliques et améliore la précision analytique, surtout dans une matrice de composition très fluctuante. En effet la composition saline (Na, Sr...) et notamment en sulfates des lixiviats varie au cours du temps et d'un échantillon à l'autre : le rapport entre les métaux de transition et le soufre dans les lixiviats peut varier d'un facteur 1 à 20, au cours du processus d'altération et induire des effets « exaltateurs » en émission plasma. Avec l'ajout d'un standard interne, ces dérives sont compensées et les vitesses de lixiviation (k) des métaux (Ca, Fe, Mg, S...) sont estimées et comparées avec précision. Les protocoles d'analyse ont été certifiés à l'aide de géostandards (NCSDS 36006 et NSCDS 36004).

## 10.2 Quantification des anions par chromatographie ionique

Les anions ont été quantifiés par chromatographie ionique (ICS 3000, Dionex corp.) équipée d'une colonne IonPac® (AS 20, 4 mm x 50 mm, Dionex corp.). La séparation isocratique est réalisée à un débit de 1 ml/min. La phase stationnaire est constituée d'un polymère échangeur d'anions hyperbranché associé un substrat polymérique à base de sulfonates (7,5 mm de diamètre). Le chromatographe utilise un générateur d'éluant sans réactif (cartouche EGC II KOH) afin de produire un éluant à base d'hydroxyde de potassium. Le système est équipé d'une boucle de prélèvement de 25 µl, associée à un échantillonneur automatique. Pour les principaux anions dosés, (sulfates, nitrates, chlorures...), la limite de quantification était de 50 µg.l<sup>-1</sup> avec une incertitude de 60 % selon la norme NF T 90-210. L'acquisition des analyses est contrôlée à l'aide du logiciel Chromeleon® version 6.80 (Dionex Sunnyvale, CA, USA).

## 11 Analyses physico-chimiques des substrats solides

Les caractéristiques initiales ainsi que les transformations minéralogiques du COx au cours des différentes expériences en conditions de laboratoire et in situ ont été déterminées par l'utilisation, en parallèle, de la diffraction des rayons X (DRX) et de la spectroscopie infrarouge (FTIR). Ces deux techniques sont complémentaires et permettent d'apprécier les multiples phases du COx.

### 11.1 Spectrométrie Infrarouge (FTIR)

La spectrométrie infrarouge par transmission est largement employée pour la caractérisation et l'analyse quantitative des phases organiques ou minérales dans les échantillons de sols, sédiments et roches. Cette méthode d'analyse vibrationnelle est particulièrement sensible à la présence de certains groupements moléculaires organiques (methyl, carboxyl, ...) ou inorganiques (carbonyl, silanol, hydroxyl,...) entrant dans la composition de minéraux hydroxylés, silicatés ou carbonatés. Couplée à l'interférométrie, la spectroscopie IR favorise la détection des composés présents en faibles quantités et l'identification des interactions molécule-support par une résolution accrue des bandes de vibrations (Résolution <1 cm<sup>-1</sup>).

Le spectromètre FTIR Bruker Vector 22, utilisé pour cette étude, exploite un interféromètre RockSolid (type Michelson) muni d'une séparatrice Ge/CsI et d'un laser He-Ne ( $\lambda = 632 \text{ nm}$ , 15823 cm<sup>-1</sup>). L'enregistrement des spectres entre 7500 – 370 cm<sup>-1</sup> (1,3 – 27 µm) est réalisée avec une source IR Glowbar (SiC) et un détecteur DTGS. Avant analyse et pour réduire au maximum la contribution de l'eau d'hydratation dans les spectres IR, les échantillons sont

déshydratés sous vide phosphorique. Les échantillons de COx sont placés dans un dessiccateur en présence de pentoxyde de phosphore ( $P_2O_5$ ) sous vide durant 48h. Les échantillons sont broyés finement à l'aide d'un mortier en agate avant d'être incorporé dans du bromure de potassium (KBr FT-IR grade, Sigma-Aldrich 221864) : 1 à 2 mg d'échantillon pour 200mg de KBr anhydre (conservé à 120°C en étuve fermée). L'ensemble est homogénéisé dans le mortier jusqu'à obtention d'une poudre finement broyé. La poudre est compressée dans un moule à pastiller (13 mm) avec prise sous vide sous une pression de 10 tonnes afin d'obtenir une pastille translucide. Une pastille de KBr pur est réalisée avant chaque série de mesures et sert de référence.

Pour chaque spectre, 50 interférogrammes ont été réalisés et cumulés pour accroître le rapport signal/bruit des spectres obtenus. La gamme de nombre d'onde explorée est comprise entre 4000 et 400  $cm^{-1}$  (2,5-25  $\mu m$ ) avec une résolution de 2  $cm^{-1}$ .

Les spectres IR obtenus sont donnés en unité d'absorbance, qui correspond au  $\log(I_{ref}/I_{éch})$ , où  $I_{ref}$  désigne l'intensité du rayonnement transmis par la référence de KBr et  $I_{éch}$  l'intensité transmise par l'échantillon dilué dans la matrice de KBr. À chaque spectre, la contribution de la vapeur d'eau atmosphérique résiduelle et du dioxyde de carbone est soustraite.

### 11.2 Diffraction de rayons X (DRX)

Les spectres de diffraction des rayons X ont été réalisés sur des échantillons d'argilite (brute ou vieillis) réduit en poudre. Un protocole de broyage et de conservation en dessiccateur similaire à celui utilisé pour les mesures IR a été utilisé pour conditionner et conserver les échantillons de COx broyés à l'abri de l'air et de l'humidité.

Les analyses ont été réalisées au LIEC site Charmois à l'aide d'un diffractomètre Bruker D8 Advance équipé d'un détecteur LynxEye. Le rayonnement X ( $\lambda = 1,78897 \text{ \AA}$ ) est émis par une source au cobalt à 35 KV et 45 mA. La durée d'analyse est d'environ 1h30 pour un angle  $2\theta$  variant de 3° à 64° avec un pas de 0,035° et un temps d'acquisition par pas de 3s. Cette analyse a permis d'obtenir des données semi-quantitatives et d'apprécier l'abondance relative des phases minéralogiques cristallisées dans les échantillons.

### 11.3 Tomographie X

La tomographie X est une technique d'imagerie non destructive qui révèle les caractéristiques de la structure interne de matériaux. Cet outil permet d'explorer l'architecture d'échantillons solides avec une résolution qui peut être inférieure au micromètre.

Un faisceau colimaté de rayons X traverse le bloc de matière et est absorbé en fonction de la nature et de la densité des constituants rencontrés. L'échantillon est exposé séquentiellement aux rayons X sous différents angles afin d'obtenir une série de radiographies 2D radiales. Après une opération dite de "reconstruction", les images acquises servent à la visualisation 3D des variations d'atténuation des rayons X à travers l'objet. Les corps les plus denses et les plus absorbants sont brillants et les vides apparaissent en noir. Le contraste de l'image tomographique est directement lié au numéro atomique des éléments constitutifs de l'objet. La tomographie 3D renseigne sur la densité, la forme, la composition, et répartition spatiale des éléments constitutifs du matériau. Elle met aussi en évidence les défauts de structures, les discontinuités et hétérogénéités, soulignées par la présence de pores, de vides, d'inclusions ou de phases minérales très variées.

Le tomographe à rayons X utilisé dans cette étude, disponible au Laboratoire Géoressources (OTELo), est un Nanotom Phoenix (GE). Il est équipé d'une source de rayons X nano-foyer (180kV, 15W) équipée de cibles interchangeable. La puissance de la source est ajustée en fonction de la taille et de la densité des objets à étudier : objets ou tissus biologiques, roches, sédiments, ... (Mode 0, voltage 105Kv, ampérage 120  $\mu$ A, taille d'un voxel : 23  $\mu$ m). La taille des objets tomographiés peut varier de moins de 1 mm à une dizaine de centimètres maximum. L'imageur est constitué d'un capteur CMOS de 5 millions de pixels. La résolution spatiale peut atteindre 0,5  $\mu$ m pour les plus petits échantillons.

Dans cette étude, pour étudier le développement du système racinaire et les formations minérales primaires et secondaires, des piluliers en polypropylène de diamètre 35 mm ont été utilisés. Les piluliers remplis d'un mélange de CO<sub>x</sub> et de sable de Fontainebleau, avec ou sans plantules sont placés sur la platine goniométrique rotative du tomographe. Pour éviter toute déshydratation et modification de structure interne durant la phase d'acquisition (8h), le pilulier est humidifié et scellé hermétiquement à l'aide d'un bouchon doublé par un film de paraffine. Les parties aériennes des plantules sont sectionnées. Dans ces conditions opératoires, la résolution maximale est d'environ 2  $\mu$ m par pixel. Après semis, les microcosmes ont été placés à l'obscurité durant 48h.

Les dispositifs ont une faible largeur puisque la définition de la reconstitution en trois dimensions issue d'une tomographie X est inversement proportionnelle à la taille de l'objet. Dans ces conditions, la définition de tomographie est de 26\*26\*26  $\mu$ m<sup>3</sup> (voxel).

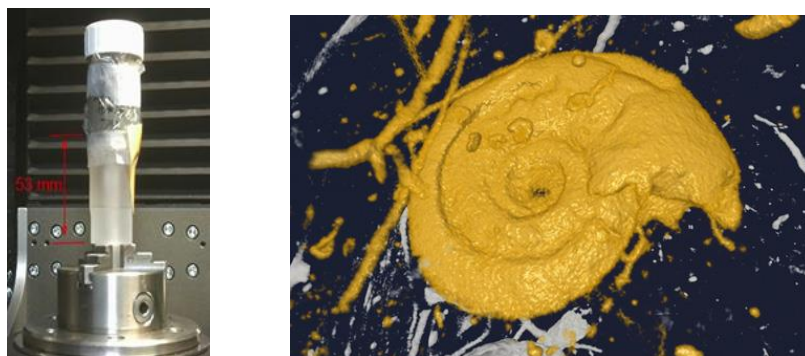


Figure 20: Microcosme de lavande dans le microtomographe X – Tomographie X d'un détail

## 12 Traitements statistiques et analyses des données

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel Xlstat (version 2012 4.03). Les données présentées sous forme de graphique ou de tableau sont les moyennes et les écarts-types. Un test de Shapiro-Wilk est utilisé pour vérifier la normalité d'un échantillon. Des analyses de la variance (ANOVA) à un facteur ou à deux facteurs sont réalisées selon une distribution normale, suivi d'un test de comparaisons multiples de Fisher (LSD). Les moyennes partageant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes ( $p < 0,05$ ). Pour les données en pourcentage, les valeurs ont été transformées en arcsinus avant que les tests statistiques ne soient réalisés.

Pour les deux expérimentations du chapitre IV portant sur les études des espèces anioniques et cationiques issues COx et dont la lixiviation dépend du volume percolé, des modèles de réactions cinétiques d'ordre 1 ou d'ordre 0 ont été utilisées. Les ordres réactionnels appropriés ont été estimés par régression linéaire de variation discrète de concentration  $\Delta[M]/\Delta V = f([M])$ .

L'établissement du modèle d'ordre 1 permet d'observer une cinétique de lixiviation qui dépend linéairement de la quantité de l'élément considéré (M). L'équation différentielle décrivant les cinétiques d'ordre 1 est :

$$r = d[M] / dV = -k [M]^n \quad n = 1$$

Avec M est la quantité d'élément lessivé ( $\mu\text{M}$  par gramme de COx), V le volume réactionnel percolé (ml), r la cinétique de lixiviation ( $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) et k la constante cinétique d'ordre ( $\text{ml}^{-1}$ ).

L'établissement du modèle d'ordre 0 permet d'observer une cinétique de lixiviation qui ne dépend pas linéairement de l'élément considéré (M). L'équation différentielle décrivant les cinétiques d'ordre 0 est :

$$r = d[M] / dV = k$$

Avec  $M$  est la quantité d'élément lessivé ( $\mu\text{M}$  par gramme de  $\text{CO}_x$ ),  $V$  le volume réactionnel percolé (ml),  $r$  la cinétique de lixiviation ( $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) et  $k$  la constante cinétique d'ordre 0 ( $\text{mL}^{-1}$ ).

Les quantités lixiviées cumulées en éléments, en fonction du volume, pour les réactions dont les ordres réactionnels, en anions et cations inorganiques, répondent à une équation d'ordre 0 sont caractérisées par l'équation suivante :

$$Q_M = Kv$$

où  $Q_M$  est la quantité lixiviée de l'élément  $M$ .

Pour les deux expérimentations du chapitre IV, un modèle de réaction cinétique de premier ordre a été utilisé quel que soit l'anion ou le cation considéré. Les quantités cumulées en éléments lixiviés en fonction du volume sont caractérisées par l'équation exponentielle suivante :

$$Q_M = Q_{\max}(1 - e^{-kv})$$

où  $Q_M$  est la quantité lixiviée de l'élément  $M$  et  $Q_{\max}$  est la quantité lixiviée maximale d'un élément.



## Chapitre III. Molécules antioxydantes et plantes sélectionnées

---



Ce chapitre a pour objectif d'identifier des plantes, et des molécules antioxydantes d'origine végétale, d'intérêt pour la végétalisation des verses et de mener des expériences préliminaires au laboratoire pour tester la faisabilité de cultures de plantes rustiques sur le CO<sub>x</sub>. Il s'agit de :

- Dresser un bilan des connaissances sur les molécules aromatiques à caractère antioxydant et antimicrobien et sur les plantes capables de les produire,
- Identifier et sélectionner des molécules antioxydantes et des plantes d'intérêt susceptibles de se développer sur le CO<sub>x</sub>, et de réguler les processus d'altération physique, chimique et microbiens des sols, et plus particulièrement des argilites du Callovo-Oxfordien,
- Tester ces molécules en conditions de laboratoire, afin de préparer les études *in situ* qui seront évoquées dans la suite de ce travail (Chapitre IV).

### **1 Les plantes endémiques des verses**

Afin de guider la recherche de plantes candidates pour végétaliser les verses, les espèces « indigènes » ont été étudiées afin de discerner des caractères communs susceptibles d'expliquer leur développement et leur maintien au sein de ces nouveaux écosystèmes. Comme le montre l'analyse photographique de la répartition floristique sur les verses, les plantes se développent préférentiellement en haut et en bas de pentes des verses alors qu'elles sont quasiment absentes sur les tables des verses (Figure 21). D'après les contraintes édaphiques relevées, cette étagement et distribution des plantes est due à plusieurs facteurs :

- Un gradient d'humidité : le haut des verses étant plus aride que le bas,
- Le flux de nutriments per descendum, générés par la désagrégation de l'argilite et l'altération des minéraux et l'érosion des parties somitales,
- Des effets de compaction et de tassements plus intenses en haut des verses et moins favorables à la germination et au développement racinaire.



Figure 21 : Photographies de la végétation « endémique » de la verse âgée (26.10.12) ; *Tussilago farfara* (a) ; *Cirsium vulgare* et *Picris hieracioides* (b).

Un relevé floristique des plantes identifiées sur les verses âgées et fraîches fournit les coefficients d'abondance-dominance et de sociabilité (Tableau 5).

L'identification des espèces se développant spontanément sur les verses, montre que les plantes autochtones appartiennent aux familles botaniques des Astéracées, Polygonacées, Fabacées, Apiacées, Chénopodiacées et Poacées. D'un point de vue phytosociologique, pour la plupart des espèces, les individus ont une répartition sporadique et ont ainsi été retrouvés isolés. Seuls les individus d'une espèce, *Tussilago farfara*, de la famille des Asteracées, ont été trouvés en petits groupes isolés les uns des autres. Au niveau de leur abondance, la majorité des espèces ont un coefficient de recouvrement de la surface des verses compris entre 1 % et 5 %. Quelques espèces comme *Persicaria maculosa*, *Sonchus oleraceus* et *Chenopodium polyspermum* ont été relevées de manière disparate et seuls quelques rares individus ont été notés. *Tussilago farfara* réparti en petits groupes isolés possède le coefficient d'abondance le plus important, entre 5 % et 25 %. Si l'on se réfère à la bibliographie ce sont des plantes pionnières annuelles. Certaines espèces (*Tussilago farfara*,

*Rumex crispus*, *Persicaria maculosa*) affectionnent des sols humides et d'autres (*Daucus carota*) des sols drainants. Elles synthétisent toutes des composés foliaires et/ou racinaires qui possèdent des activités antioxydantes et antimicrobiennes. Ce caractère d'intérêt pourrait être à l'origine de leur développement et de leur maintien sur l'argilite constitutive des vers.

Tableau 5 : Relevé floristique et caractéristiques écophysiological des plantes des versées âgées (en haut) et fraîche (en bas) (d'après Noyere, 2012). Coefficient d'abondance-dominance (recouvrement) de Braun-Blanquet : r : plante rare (quelques pieds) ; 1 : 1 < R < 5% ; 2 : 5 < R < 25%. Sociabilité : 5 : Tapis continu, 4 : colonies ou tapis discontinus, 3 : individus groupés en tâches, 2 : individus répartis en petits groupes isolés, 1 : individus isolés

					Verse âgée	
Nom Scientifique	Nom commun	Famille	Abondance	Sociabilité		Bibliographie
Tussilago farfara L.	Tussilage	Asteraceae	2	2	Plante pionnière, rhizomateuse, héliophile sur sols pauvres, riche en argile basiques, perturbés et humide. Synthétise une huile essentielle. Activité antimicrobienne de la partie aérienne et des rhizomes (Kokoska et al., 2002) et antioxydante (rôle direct d'antioxydant de la quercétine, et indirect par augmentation du GSH et GST cellulaire) (Kim et al., 2006)	Trouvée sur la versée fraîche (même abondance et sociabilité)
Polygonum aviculare L.	Renouée des oiseaux	Polygonaceae	1	1	Propriétés antioxydantes (méthode de mesure de réduction du DPPH TEAC par diminution de l'absorbance à 517 nm et mesure d'inhibition de la réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT) par des radicaux superoxydes) (Hsu, 2006)	Trouvée sur la versée fraîche (même abondance et sociabilité)
Melilotus albus Medik.	Mélilot blanc	Fabaceae	1	1		Trouvée sur la versée fraîche (même abondance et sociabilité)
Pastinaca sativa L.	Panais	Apiaceae	1	1	Huile essentielle racinaire avec terpinolène et myristicine comme composants principaux (Lawrence, 1979 ; Kurkcuoğlu et al., 2006)	
Brassicaceae sp.			1	1		Trouvée sur la versée fraîche (même abondance et sociabilité)
Picris hieracioides L.	Picride fausse-épervière	Astéracées	1	1		Trouvée sur la versée fraîche (même abondance et sociabilité)
Daucus carota L.	Carotte sauvage	Apiaceae	1	1	Se développe sur les terrains drainants (Mitich, 1996 ; Akgul et al., 2009). Synthétise une huile essentielle au niveau des parties racinaires (Porchezian et al., 2000 ; Akgul et al., 2009) et aérienne (fleurs et feuilles avec une activité antioxydante mesurée (DPPH)) (Nehir El et Karakaya, 2004 ; Akgul et al., 2009)	Trouvée sur la versée fraîche (abondance : r ; sociabilité : 1)
Cirsium vulgare (Savi) Ten.	Cirse commun	Asteraceae	1	1		
Persicaria maculosa Gray	Renouée persicaire	Polygonaceae	r	1		Plante pionnière hygrophile Trouvée sur la versée fraîche (abondance : 1 ; sociabilité : 1)
Sonchus oleraceus L.	Laiteron maraîcher	Asteraceae	r	1	Activité antioxydante foliaire (méthodes ABTS et DPPH) (Nehir El et Karakaya, 2004 ; Xia et al., 2011)	Trouvée sur la versée fraîche (abondance : 1 ; sociabilité : 1)
Chenopodium polyspermum L.	Chénopode à graines nombreuses	Chenopodiaceae	r	1		Trouvée sur la versée fraîche (abondance : 1 ; sociabilité : 1)
Poaceae sp.			r	1		
					Verse fraîche	
Nom Scientifique	Nom commun	Famille	Abondance	Sociabilité		Bibliographie
Lactuca serriola L.	Laitue sauvage	Asteraceae	1	1		
Lactuca virosa L.	Laitue sauvage	Asteraceae	r	1		
Chenopodium album L.	Chénopode blanc	Chenopodiaceae	r	1		Se développe sur terrain sec
Fallopia convolvulus (L) A. Löve	Renouée liseron	Polygonaceae	r	1		
Papaver dubium L.	Pavot douteux	Papaveraceae	r	1	Synthétise des composés antioxydants (quercétine, lutéoline, kaempférol, Dihydrolactucine) (mesures DPPH) (Kim, 2001)	
Chenopodium album L.	Chénopode blanc	Chenopodiaceae	r	1	Une des premières plantes à se développer dans des sols fraîchement perturbés. Synthétise des composés antioxydants (kaempférol, quercétine) sous formes de glycosides (mesures DPPH) (Bylka et Kowalewski, 1997 ; Chludil et al., 2008 ; Vysochina, 2010)	
Alopecurus myosuroides Huds.	Vulpin des champs	Poaceae	r	1	Affecte les sols argileux, synthétise des composés antioxydants dérivés ou non du kaempférol, quercétine (Kim et al., 2000)	
Caryophyllaceae sp			r	1		Se développe sur les sols fraîchement perturbés
Rumex crispus L.	Oseille crépue	Polygonaceae	r	1	Se développe dans les sols riches et humides, sur sites perturbés. Synthétise des composés antioxydants tels le butanol et l'acétate d'éthyl (mesures DPPH) (Suh et al., 2011)	

## 2 Molécules antioxydantes

### 2.1 Les molécules antioxydantes d'intérêt

Comme mentionné dans le chapitre I, les plantes modifient les conditions physiques et chimiques du sol rhizosphérique par différents processus d'exsudation et d'excrétion de composés organiques très variés (Hinsinger et al., 2009). Le développement racinaire injecte dans les substrats « sol » des composés carbonés (sucres et acides organiques) et azotés (acides aminés) assimilables par les microorganismes et favorables au développement et la croissance de bactéries et champignons. Ces composés organiques d'origine racinaire ainsi que les métabolites microbiens produits peuvent selon les cas participer directement à l'altération minérale par acido-complexolyse (Marschner et al., 1997) ou au contraire réduire l'intensité des processus d'altération par oxydo-réduction de minéraux réduits comme les sulfures.

Diverses études ont été réalisées sur la stabilisation de l'altération des sulfures à l'aide de molécules d'origine organique ou minérale. Le ue (écosystème, animaux, homme)

Tableau 6 fournit une synthèse non exhaustive de ces travaux. Mustin (1992), Méline (1995) et Perdicakis et al. (2001) ont ainsi démontré qu'un extrait synthétique d'huile végétale essentielle naturelle, le thymol, pouvait inhiber ou réguler l'altération électrochimique et microbienne des sulfures de fer, comme la pyrite. Son utilisation comme agent stabilisant sur l'oxydation des composés sulfurés du COx est donc envisageable. Les molécules organiques, telles que les tannins, ubiquistes au sein du règne végétal, ont également été étudiées et caractérisées pour leur action limitante sur les cinétiques d'altération minérale et le développement des bactéries des sols (Hagerman et al. 1998; Kraus et al. 2003). Certains composés aromatiques ou intervenants dans la fabrication d'huiles essentielles ont également été testés afin de neutraliser les processus de drainage minier acide.

Dans le cadre de ce travail, la recherche de molécules d'intérêt a été orientée sur des molécules organiques d'origine végétale à fort pouvoir antioxydant et antimicrobien. Le ue (écosystème, animaux, homme)

Tableau 6 ci-après regroupe de manière synthétique les caractéristiques physico-chimiques et biologiques de composés qui ont été ainsi identifiés. Pour établir cette liste, la capacité des plantes à s'implanter sur le COx et à produire ces molécules en conditions de laboratoire, a été prise en compte. Ces composés ont également été criblés avec des critères spécifiques assurant leur innocuité biologique (écosystème, animaux, homme)

Tableau 6 : Synthèse des travaux sur la stabilisation et la passivation électrochimique de l'oxydation des sulfures avec des molécules organiques et des oxyanions (d'après Sorrenti, )

Molécules	Références bibliographiques	Efficacité	Remarques
<b>Phosphates</b>	<i>Kalin et Van Everdingen, 1988, et (Evangelou, 1995, 1996), Meek, 1991, Drouet et al., 1999, Elsetinow et al., 2001</i>	Bonne pH>3,5	Précipitation de phosphate ferrique (FePO <sub>4</sub> ) en surface des sulfures Passivation électrochimique stable à pH<4
<b>Phospholipides</b>	<i>Elsetinow et al., 2001, Zhang et al., 2003, Kargbo et al., 2004</i>	Bonne tout pH	Prétraitement nécessaire Passivation stable - Oxydation réduite de 80 % à pH2 Inconvénients : coûts et compétition entre molécules en présence de silicates
<b>Oléates</b>		Bonne pH=6	Adsorption et himisorption en mono-couche Oxydation réduite de 95 % après 30 jours
<b>Acides oxalique, tannique</b>	<i>Belzile et al., 1997, Hagerman et al. 1998; Kraus et al. 2003</i>	Moyenne	Peu utilisé
<b>Acétyl acétone</b>	<i>Belzile et al., 1997</i>	Moyenne	Sans prétraitement Inconvénients : efficacité réduite avec le temps
<b>Polamines (EDTA, TETA)</b>	<i>Chen et al., 2006</i>	Bonne	Peu utilisé Inhibition rapide Stable à long terme
<b>Substances humiques</b>	<i>Backes et al., 1988, Lalvani et al., 1996, Belzile et al., 1997, Avena et Koopal, 1999, Peiffer et Stubert, 1999, Rath et al., 2000</i>	Bonne à pH acide- neutre	Inhibition rapide de l'oxydation par complexation Forte affinité pour les cations métalliques trivalents
<b>Silicates de sodium</b>	<i>Zhu et al., 1994, Evangelou, 1996, Fytas et al., 2000, Benzaazoua et al., 2001, Kargbo et al., 2004</i>	Optimale pH=6	Prétraitement favorable Couche de passivation épaisse (6 µm) et stable chimiquement Efficacité réduite à pH<3
<b>Thymol</b>	<i>Mustin, 1992, Méline, 1995, Meline et al., 1996, Perdicakis et al., 2001</i>	Bonne	Prétraitement favorable Adsorption rapide en présence Fe <sup>3+</sup> Inhibition lente Oxydation du thymol (film protecteur)

## 2.2 Le camphre

Le camphre, ou 1,7,7-triméthylbicyclo[2,2,1]heptan-2-one (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O) est synthétisé par le camphrier (*Cinnamomum camphora*) appartenant à la famille des Lauracées. Il peut être synthétisé chimiquement à partir du pinène. Il s'avère être toxique en cas d'ingestion. Cette cétone peut être dissoute dans l'eau à hauteur de 1,6 g.l<sup>-1</sup> et est plus facilement soluble dans les solvants organiques. Il est utilisé pour ses propriétés antibactériennes et est synthétisé dans l'huile essentielle de certaines espèces de thym (*Thymus moroderi* et *Thymus piperella*) dont la composition en camphre peut être supérieure à 26% (Ruiz-Navajas et al., 2012). Il est aussi étudié pour ses capacités d'antioxydant (Sellami et al., 2012).



### 2.3 Le carvacrol

Le carvacrol, ou 2-méthyl-5-(propan-2-yl)phénol ( $C_{10}H_{14}O$ ) est un phénol mono-terpénoïde obtenu à partir d'huile essentielles des plantes de la famille des Lamiacées comme le thym (Arrebola et al., 1994). Certains écotypes de *Thymus pulegioides* synthétisent des huiles essentielles dont la concentration en carvacrol est de plus de 24% (Ložienė et al., 2007). Le carvacrol est un isomère du thymol qui possède des capacités antioxydantes importantes (Lee et al., 2005; Ložienė et Venskutonis, 2005). Il est néanmoins très peu soluble dans l'eau, mais plus facilement dans l'alcool. Comme le thymol, il possède des propriétés antibactériennes (Srivastava, Saxena, et Baby, 1999) et antifongiques (Perez-Alfonso et al., 2012).

### 2.4 L'eucalyptol

L'eucalyptol (1,8 cinéol), ou 1,3,3-triméthyl-2-oxabicyclo[2,2,2]octane ( $C_{10}H_{16}$ ) est essentiellement issus des plantes de la famille des Myrtacées telles que les Eucalyptus. Il a également été analysé chez les Astéracées (Candan et al., 2003), Lauracées (Ramos et al., 2012) et Lamiacées (Ozkan et al., 2010). C'est un éther mono-terpénoïde qui est très peu soluble dans l'eau, mais miscible dans l'alcool. Il est caractérisé par une faible toxicité biologique, un faible pouvoir antioxydant (Lee et al., 2005) et possède des propriétés antibactériennes (Ramos et al., 2012) et antifongiques (Morcia et al., 2012).

### 2.5 L'eugénol

L'eugénol, ou 4-allyl-2-méthoxyphénol ( $C_{10}H_{12}O_2$ ) est synthétisé entre autres par le giroflier (*Syzygium aromaticum*) de la famille des Myrtacées. Ce phénol possède une faible solubilité dans l'eau et est connu pour ses propriétés antiseptiques (Friedman et al., 2002), fongicides (Vázquez et al., 2001; He et al., 2007) et antioxydantes (Gutiérrez-Larraínzar et al., 2012).

### 2.6 Le linalol

Le linalol, ou 3,7-Diméthyl-1,6-octadiène-3-ol ( $C_{10}H_{18}O$ ) est obtenu à partir d'huile essentielle comme celles des plantes de la famille des Lamiacées. Certains écotypes de thym, plus spécifiquement ceux de *Thymus pulegioides*, synthétisent une huile composée à plus de 80% de linalol (Ložienė et al., 2007). Ce dernier possède deux stéréo-isomères, le licareol et le coriandrol. En tant qu'alcool terpénique, il possède une faible solubilité et a été sélectionné pour son innocuité et pour sa capacité antioxydante. Il est également connu pour ses activités bactéricides (Scortichini et Rossi, 1991) et fongicides (Pattnaik et al., 1997).

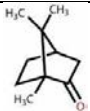
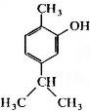

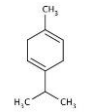

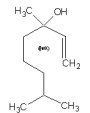
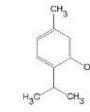
## 2.7 Le thymol

Le thymol, ou 5-méthyl-2-isopropyl-1-phenol ( $C_{10}H_{14}O$ ) est obtenu à partir d'huiles essentielles des plantes de la famille des Lamiacées, comme le thym. Certains écotypes de *Thymus pulegioides* synthétisent des huiles essentielles dont la composition en thymol est de plus de 26% (Ložienė et al., 2007). Il peut également être synthétisé chimiquement à partir de p-cymène. C'est un composé volatil que l'on peut dissoudre à raison d'1 g.l<sup>-1</sup> d'eau. Il est connu pour ses activités bactéricides (Schaffer et Tilley, 1927), fongicides (Dersarkissian et Goodberry, 1980), et antioxydantes (Lee et al., 2005; K. Ložienė et Venskutonis, 2005). Du fait de sa faible toxicité, il est utilisé comme agent conservateur pour des aliments (Yanishlieva et al., 1999). Il est aussi utilisé pour son action stérilisante sur les microorganismes des sols (Berthelin et al., 1974; Berthelin & Belgy, 1979). Le rôle d'inhibition de l'oxydation des pyrites est possible par la formation d'un film de thymol oxydé complexé au Fe (III) de la surface des pyrites (Perdicakis et al., 2001). La concentration minimale inhibitrice de l'oxydation des pyrites (CMI) a été évaluée à 2 mg.l<sup>-1</sup> (Meline et al 1996). Néanmoins, sous l'effet d'un lavage, la sorption du thymol sur la surface des pyrites est réversible (Brickett, Hammack, et Edenbom, 1995).

## 2.8 Les terpinènes

Les terpinènes sont des terpènes mono ou poly-cycliques, qui possèdent de nombreuses propriétés physiologiques chez les plantes et les animaux (antioxydants, stabilisants membranaires,...). En fonction de leur structure chimique, ils sont classés en  $\alpha$ -terpinène,  $\gamma$ -terpinène, produits par biosynthèse, et  $\beta$ -terpinène, produit chimiquement à partir du sabinène. Ces trois hydrocarbures isomériques diffèrent par la position de la double liaison carbone-carbone. Les  $\alpha$ -terpinène et  $\gamma$ -terpinène ont été isolés chez les plantes de la famille des Lamiacées (Arrebola et al., 1994), Myrtacées (Knight & Hausen, 1994), Chénopodiacées (Jiménez-Osornio et al., 1996) et Wintéracées (Ciccio, 1997). Ils possèdent des capacités antibactériennes (Demetzos, Perdetzoglou, et Tan, 2001) et antioxydantes (Pluzhnikov et Kovtun, 1994; Tepe et al., 2005). Ils présentent également des propriétés allélopathiques négatives sur le développement de certaines plantes (Jiménez-Osornio, Kumamoto, et Wasser, 1996). D'après la bibliographie, les terpinènes ont un seuil de toxicité bas sur le vivant (Araujo et al., 1996) et sont pratiquement insolubles dans l'eau.

Tableau 7 : Caractéristiques physico-chimiques de composés antioxydants d'origine végétale

Formule	Molécule	Synthèse (naturelle /chimique)	Solubilité	Remarques
<b>Camphre</b> <b>C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O</b>		Synthèse chimique à partir du pinène. Synthèse naturelle chez les plantes de la famille des Lauracées. Sous forme de traces chez le thym, <i>Thymus pulegioides</i> (Ložienė et al., 2007).	Solubilité de 1 ml dans 800 ml d'eau, 1 ml d'alcool, 0,4 ml d'acétone.	Capacités antioxydantes (Sellami et al., 2012).
<b>Carvacrol</b> <b>C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O</b>		Synthèse naturelle chez les plantes de la famille des Lamiacées (Arrebola et al., 1994). Certaines huiles de <i>Thymus pulegioides</i> sont composées à plus de 24 % de carvacrol, avec de fortes concentration en composés phénoliques (18,8 mg.g <sup>-1</sup> EAG <sup>12</sup> ) (Ložienė et al., 2007).	Pratiquement insoluble dans l'eau. Soluble dans l'alcool.	Propriétés antibactériennes (Srivastava et al., 1999) et fongicides (Perez-Alfonso et al., 2012). Pouvoir réducteur-important : 100 % d'inhibition d'oxydation de l'hexanal en acide hexanoïque à 5 µg ml <sup>-1</sup> de carvacrol en 30 jours (Lee et al., 2005) et 33 % de réduction de ABTS <sup>+</sup> (Test TEAC) <sup>3</sup> (Ložienė et Venskutonis, 2005).
<b>Eucalyptol (cinéole)</b> <b>C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O</b>		Synthèse naturelle chez les plantes de la famille des Myrtacées.	Pratiquement insoluble dans l'eau, Miscible dans l'alcool.	Faible pouvoir antioxydant, avec 5% d'inhibition d'oxydation de l'hexanal en acide hexanoïque à 5 µg ml <sup>-1</sup> d'eucalyptol et 11% à 50 µgml <sup>-1</sup> en 30 jours (Lee et al., 2005).
<b>Terpinènes</b> <b>C<sub>10</sub>H<sub>16</sub></b>		Synthèse naturelle de α-terpinène et γ-terpinène. Synthèse chimique de β-terpinène.	Pratiquement insoluble miscible dans l'alcool.	Propriétés antibactériennes (Demetzos et al., 2001) et antioxydantes (Tepe et al., 2005).
<b>Eugénol</b> <b>C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub></b>		Synthèse naturelle chez les plantes de la famille des Myrtacées.	Pratiquement insoluble dans l'eau. 1 ml dans 2 ml d'alcool à 70 %.	Propriétés antiseptiques (Friedman et al., 2002), fongicides (Vázquez et al., 2001; He et al., 2007) et antioxydantes (Gutiérrez-Larraínzar et al., 2012).
<b>Linalol</b> <b>C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O</b>		Synthèse chimique de licareol (forme L) et coriandrol (forme D). Synthèse naturelle chez les plantes de la famille des Lamiacées. Certaines huiles de <i>Thymus pulegioides</i> sont composées à plus de 80% de linalol avec une faible synthèse en composés phénoliques (flavonoïdes et flavonols) de 7,42 mg.g <sup>-1</sup> EAG (Ložienė et al., 2007) .	Licareol pratiquement insoluble dans l'eau, miscible avec l'alcool.  Coriandrol soluble dans 10 volumes d'alcool à 50 %, et dans 4 volumes d'alcool à 60 %.	Propriétés bactéricides (Scortichini & Rossi, 1991) et fongicides (Pattnaik et al., 1997). Pouvoir réducteur faible avec 3% d'inhibition d'oxydation de l'hexanal en acide hexanoïque à 5 µg ml <sup>-1</sup> de linalol en 30 jours (Lee et al., 2005) et 12,5 % de réduction de ABTS <sup>+</sup> (Test TEAC) (Ložienė et Venskutonis, 2005).
<b>Thymol (3-p-cyménol)</b> <b>C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O</b>		Synthèse chimique à partir de p-cymène. Synthèse naturelle chez les plantes de la famille des Lamiacées. Certaines huiles de <i>Thymus pulegioides</i> sont composées à plus de 26% de thymol, avec de fortes concentration en composés phénoliques de 19,77 mg.g <sup>-1</sup> EAG (Ložienė et al., 2007).	Solubilité de 1 g.l <sup>-1</sup> d'eau, 1% d'alcool	À 2 mg.l <sup>-1</sup> : inhibition réversible de l'altération biologique des pyrites À 80 mg.l <sup>-1</sup> : inhibition de l'altération biologique par effet bactéricide (Meline et al., 1996) Protection galvanique des pyrites par formation d'un film de thymol oxydé (solution de thymol à 1,3*10 <sup>-3</sup> M soit 195,3 mg.l <sup>-1</sup> ) (Perdicakis et al., 2001) Pouvoir antioxydant important, avec 95% d'inhibition d'oxydation de l'hexanal en acide hexanoïque avec 5µg ml <sup>-1</sup> de thymol en 30 jours (Lee et al., 2005) et 29% de réduction de ABTS <sup>+</sup> (Ložienė et Venskutonis, 2005) Sorption réversible du thymol oxydé sur la pyrite (Brickett et al., 1995)

1 En milligramme d'Equivalent en Acide Gallique(EAG) par gramme d'extrait (méthode de mesures Folin-Ciocalteu) Cette méthode détermine la concentration en polyphénols de l'extrait

2 Réduction du chromophore synthétique 2,2'- azino-bis (3 - éthylbenzothiazoline -6- sulfonique acide) ou ABTS (détermination du TEAC). En présence d'antioxydant, le radical-cation ABTS<sup>+</sup> est réduit, ce qui provoque une diminution l'absorbance mesurée par spectrophotométrie à nm (Sochor et al., 2010)

### 3 Plantes produisant des antioxydants

#### 3.1 Les familles botaniques d'intérêt

Afin de poursuivre les recherches effectuées sur les composés antioxydants, des critères de sélection ont été définis afin d'établir le choix des plantes d'intérêt. La recherche et la sélection des plantes ont été définies en fonction de critères généraux pour la végétalisation et de critères plus spécifiques adaptés au matériau à coloniser et aux contraintes *in situ* définies dans le chapitre I. Le Tableau 8 synthétise les contraintes édaphiques et climatiques, évoquées dans le chapitre II, auxquelles la végétation sélectionnée devait répondre. Trois principales qualités ont ainsi été définies afin de caractériser et définir des plantes d'intérêt dans un contexte de végétalisation des vers de COx et de limitation de son oxydation. Cette plante doit :

- synthétiser des molécules antioxydantes au sein des parties aériennes et/ou racinaires,
- avoir une croissance aérienne modérée et persistante en hiver,
- et développer un système racinaire profond à forte capacité de couverture.

Tableau 8 : Critères de sélection de plantes d'intérêt dans un contexte de végétalisation de vers de COx (modifié d'après Bourgoin et al., 1989)- Caractéristiques écophysologiques requises.

<b>Qualités</b>	<b>Plante « facilitatrice »</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Participe à l'enrichissement du sol en matière organique</li> <li>- Permet l'intégration d'autres espèces</li> </ul>
	<b>Entretien réduit</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Croissance des parties aériennes modérées</li> <li>- Résistances aux prédateurs et ravageurs de cultures</li> </ul>
	<b>Plante « stabilisatrice »</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Synthèse d'antioxydants</li> <li>- Forte capacité à couvrir le sol</li> <li>- Système racinaire profond à forte capacité de couverture</li> <li>- Pérennité</li> <li>- Installation rapide</li> </ul>
<b>Contraintes</b>	<b>Contraintes édaphiques du site de stockage</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contraintes physiques :               <ul style="list-style-type: none"> <li>o Résistance à la sécheresse du substrat drainant, et la formation d'une croûte indurée en surface</li> <li>o Capacité à se développer sur l'argilite fraîchement excavé</li> <li>o Capacité à germer sur le COx ou transplantation possible</li> <li>o Résistance à l'écrasement et à l'érosion</li> </ul> </li> <li>- Contraintes chimiques :               <ul style="list-style-type: none"> <li>o Faibles besoins nutritifs</li> <li>o Résistance aux fortes salinités et au pH basique</li> </ul> </li> </ul>
	<b>Contraintes climatiques du site de stockage</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Climat océanique à tendance continentale :               <ul style="list-style-type: none"> <li>o Résistance à la sécheresse estivale</li> <li>o Résistance à l'enneigement</li> <li>o Résistances aux fortes (températures moyennes de 18,7°C à 24°C en Juillet) et faibles températures (températures moyennes de 0°C à 2,5°C en Janvier)</li> <li>o Précipitations moyennes annuelles entre 700 et 1000 mm/an</li> <li>o Température moyenne annuelle de 10°C</li> </ul> </li> </ul>

Le choix du type de croissance a été établi afin de limiter l'entretien des parties aériennes. La chute des parties aériennes au sol pouvait aussi maximiser le transfert de composés antioxydants vers le sol. La plante devait également prospecter le substrat et s'installer rapidement afin de limiter l'érosion du substrat, et l'entraînement de particules et éléments minéraux vers les écosystèmes environnants. Enfin, la capacité à former des mycorhizes, qui facilite l'établissement, la croissance et la nutrition minérale des plantes en particulier en conditions de stress (Smith & Read, 2010), a été considérée comme un critère pertinent à prendre en compte.

Les principales caractéristiques des huiles essentielles (e.g. rendement et spécificité, lieu de production au sein du végétal, ...) et de l'écophysiologie des plantes (e.g. croissance des parties aériennes et racinaires, symbiotes racinaires, ...) ont ainsi été référencés pour des familles botaniques produisant des molécules antioxydantes et susceptibles de stabiliser un substrat. Trois familles ont ainsi été identifiées : les Lamiacées, Astéracées et Éricacées.

Comme il sera montré dans les paragraphes suivants, ces trois familles de plantes ont comme caractéristiques communes :

- Résister à la sécheresse et d'avoir de faibles besoins nutritifs et en eau, notamment grâce à la présence de mycorhizes qui permettent,
- Disposer d'un système racinaire efficace, robuste et mycorhizé maximisant la prospection du substrat et assurant la mise à disposition d'éléments nutritifs, y compris dans les environnements pauvres ou extrêmes,
- Avoir des actions antibactériennes, antifongiques et antioxydantes grâce à la synthèse de molécules spécifiques comme le carvacrol, le thymol ou le linalol.

### 3.1.1 Les Lamiacées

Les plantes de cette famille botanique, en particulier la lavande et le thym, possèdent les qualités requises, en termes de synthèse d'antioxydant et de rusticité, et pourraient potentiellement résister aux contraintes du site à végétaliser.

Au sein des Lamiacées, le genre *Lavandula* contient les espèces de lavandes les plus rustiques, en particulier *Lavandula angustifolia*. Cette lavande se développe au sein de régions sèches, ensoleillées, rocailleuses, et aime une terre légère et bien drainée. Elle synthétise des molécules aux vertus antioxydantes, bactéricides et fongicides comme le linalol et l'acétate de linalyl (Garcia-Vallejo, 1992; Hassiotis et al., 2010). Une de ses qualités remarquables est sa forte tolérance aux milieux salés, sans mortalité ni même apparition de

symptômes. D'après Zollinger *et al.* (2007), le seuil de tolérance en sels ( $\text{CaCl}_2$  et  $\text{NaCl}$ ) est limité à  $5 \text{ g.l}^{-1}$ . Des mécanismes spécifiques d'accumulation et de tolérance au sodium sont à l'origine de cette adaptation et pourraient diminuer l'impact des stress hydriques et nutritifs dus à l'accumulation d'ions aux abords des racines qui gêne l'implantation d'autres espèces (Scholtus, 2003). L'augmentation de la succulence des feuilles de *Lavandula angustifolia* ou la séquestration vacuolaire ont pour effet de normaliser les concentrations cytoplasmiques. En effet, Zollinger *et al.* (2007) ont mesuré des teneurs en sels pouvant atteindre  $7,7 \text{ g kg}^{-1}$  pour les plantes irriguées avec une solution saline à  $5 \text{ g.l}^{-1}$ . Enfin, les plantes halophytes contrent aussi ces stress salins par l'excrétion via des glandes à sel spécialisées ou par concentration des sels dans les feuilles âgées et sénescentes (Greenway et Munns, 1980 ; Munns, 2002 ; Zollinger *et al.*, 2007).

Néanmoins, lors d'une culture *in vitro* de *Lavandula angustifolia*, de fortes variabilités en taille des plantules ont été constatées (Nobre, 1996 ; De Bona *et al.* 2010; 2012). L'apport d'hormones de croissance permet d'homogénéiser les tailles des individus. Ainsi, l'ajout d'acide gibbérellique force la précocité de la germination et améliore son rendement (Chavagnat, 1978). L'utilisation de cette hormone augmente la vitesse de croissance des plantes (Ruminska *et al.* 1978) et maximise son développement sur sol salé en diminuant le stress hydrique (Aglaiia Liopa-Tsakalidi *et al.*, 2011). D'après Kotsiris *et al.* (2012), une profondeur d'enracinement minimum de 30 cm est requise pour tolérer la sécheresse estivale. La racine pivotante serait, dans ce cas, d'une longueur maximale égale à deux fois la hauteur de la partie aérienne, soit 70 cm (com. pers. Mr Librex, Cultivateur de lavandes au Québec). La forte densité du feuillage garantit une bonne retenue du sol par les parties aériennes en cas de ruissellement important (Burylo *et al.*, 2012), réparti sur une hauteur de 38 cm à 62 cm (Hassiotis *et al.*, 2010). Des mycorhizes à arbuscules, avec des champignons appartenant aux Glomeromycètes, comme *Glomus intraradices*, peuvent se développer sur cette espèce de lavande (Sanchez-Castro *et al.* 2012) ou avec la famille des Diversisporacées, comme *Otospora bareai* trouvé sur les sols dolomitiques (Palenzuela *et al.*, 2008).

Le thym, autre membre de la famille des Lamiacées, synthétise des composés antibactériens et antifongiques (Stahl-Biskup et Sáez, 2002) comme le thymol, le linalol et le carvacrol (De Martino *et al.* 2009; Pavel, *et al.*, 2010). Il a une bonne résistance au gel et apprécie un sol drainant et caillouteux. Certaines espèces, comme *Thymus granatensis*, sont endémiques des sols dolomitiques et se développent à une valeur de pH de 8,2. Des mycorhizes à arbuscules, appartenant au genre *Glomus*, plus précisément, *Glomus claroideum*, *Glomus etunicatum*, et *Glomus macrocarpum* peuvent se développer sur les racines de cette espèce de thym

(Navarro-Fernandez et al. 2011). Cette dernière produit la même biomasse en période de stress hydrique ou irrigué et semble bien adaptée à la sécheresse. Mota et al. (2008) suggère que c'est une plante à faible évapotranspiration présentant une partie aérienne réduite avec de petites feuilles. Elle se développe, entre autres, sur des sols à forte concentration en Mg. Comme pour la lavande, ce mécanisme de tolérance et d'accumulation est certainement réalisé par séquestration vacuolaire au niveau des parties aériennes.

*Thymus pulegioides* est une des espèces de thym les plus rustiques qui affectionne les sols bien drainés. Elle possède un feuillage persistant, une forte résistance à la sécheresse et une importante capacité couvre sol du fait de sa pousse rapide. Ses racines sont également colonisées par des mycorhizes à arbuscules et à vésicules (Pawlowska et al. 1996), avec *Glomus pansihalos* et *Glomus constrictum*, *Glomus fasciculatum* et *Entrophospora* sp. *Thymus serpyllum* est une espèce proche de *Thymus pulegioides* et en possède les mêmes caractéristiques. L'intérêt de cette espèce vient de sa forte capacité à résister au piétinement, en raison de ses ramures à feuillage dense.

L'intérêt des espèces comme la lavande ou le thym réside dans leur capacité de « plantes facilitatrices ». En co-culture avec une autre plante, elles permettent une croissance plus élevée de cette dernière avec des concentrations foliaires en azote (N) et en phosphore (P) plus importantes. De plus, une plus grande diversité microbienne du sol est observée en présence de lavande avec une augmentation de la solubilisation des phosphates par *Pseudomonas fluorescens* par rapport au traitement témoin non planté par la lavande (Duponnois et al., 2011). Cette sélection bactérienne opérée par la lavande s'explique par une augmentation du nombre de spores mycorhiziennes et de la longueur des hyphes. Ces derniers synthétisent des acides carboxyliques qui induisent une sélection de certaines bactéries rhizosphériques (Ouahmane et al., 2006a). Cela a pour conséquence d'augmenter l'efficacité d'absorption des nutriments chez la plante en co-culture avec le thym ou la lavande (Duponnois et al., 2011). En effet les plantes mycorhizées ont accès à des formes d'azote non disponibles pour les plantes non-mycorhizées, et ont une meilleure résistance à la sécheresse (Subramanian et al., 1997; Subramanian & Charest, 1998; Azcon-Aguilar et al., 2003).

De plus, cette association plante-champignon assure un meilleur développement de la plante facilitatrice d'une part, et de la plante poussant en co-culture, d'autre part. En effet, les mycorhizes établissent un transfert de carbone préférentiel vers la lavande la première année (Duponnois et al., 2011). De même, certaines populations de *Thymus pulegioides* et *Thymus serpyllum* sont associées naturellement à *Achillea millefolium* de la famille des Astéracées. La co-culture de thym et d'achillée, favorise une allocation du carbone vers les racines de cette

dernière (Grøndahl et Ehlers, 2008). En outre, une co-culture avec une plante facilitatrice dynamise le fonctionnement de l'écosystème considéré par la mise en solution d'éléments nutritifs du sol.

### 3.1.2 Les Astéracées

Au sein de cette famille, *Achillea millefolium* est une plante assez robuste qui se développe naturellement sur les sols pauvres bien drainés et exposés au soleil. Elle a été recensée sur tous les départements français. Elle synthétise des composés à caractère antioxydants, bactéricides et fongicides comme le camphre,  $\alpha$  et  $\beta$ -thuyone et l'eucalyptol (1,8-cineole) (Orav et al., 2006; Fazal et al., 2012). Elle fait partie de la flore autochtone du site de stockage et colonise spontanément les résidus et verses les plus calcaires. Des essais de cultures d'achillée sur l'argilite du Callovo-oxfordien montrent un taux de germination de 75 % (Scholtus, 2003). Cette plante a la particularité de posséder une racine pivotante fournissant un fort ancrage au niveau du substrat. Elle est également caractérisée par une pousse rapide et par la formation de rhizomes souterrains qui émettent des stolons. Par conséquent, elle tapisse rapidement le sol et est une bonne plante de gazon. La bonne résistance mécanique de son système racinaire lui confère également une bonne tolérance à l'écrasement (Breitsameter et al., 2012). Cette plante pionnière forme aussi des mycorhizes à arbuscules et à vésicules. Elle a été recensée sur des sites calaminaires perturbés et pauvres en matière organique associée avec *Glomus fasciculatum* et *Entrophospora* sp. (Pawlowska et al. 1996).

### 3.1.3 Les Ericacées

*Calluna vulgaris*, ou Fausse-bruyère, est une plante rustique, fréquente sur les sols acides qui apprécie une exposition au soleil directe, une terre pauvre et drainante. Elle a aussi été recensée sur les sols calcaires et neutres (Fuehner et Runge, 2009).

La callune est capable de se développer sur des terrils miniers, riches en soufre et contaminés par des métalloïdes comme l'arsenic (Krausz et al., 2012). Elle synthétise des composés qui auraient des fonctions d'inhibition de la germination des graines comme l'acide phénolique, des tanins ou des flavonoïdes (Ballester et al. 1982). Elle établit des mycorhizes à éricoïdes, avec *Helotiales* majoritairement, mais également *Phialocephala fortinii*, *Cryptosporiopsis*, et *Oidiodendron* spp (Johansson, 2001). Ces associations amélioreraient l'absorption de l'azote de la callune (Zijlstra et al., 2005).



### 3.2 Composés antiseptiques et antioxydants produits par les familles d'intérêt

#### 3.2.1 Chez les Lamiacées

Des vertus antiseptiques et antioxydantes ont été relevées chez les plants de lavande (Naik et al., 2010). Des composés de type monoterpène comme le linalol, le camphre, le borneol, l'eucalyptol (1,8-cineole) et des sesquiterpènes ont été extraits des parties aériennes et analysés (Guitton, 2010). Au niveau anatomique, les huiles sont synthétisées au sein des glandes peltées et glandes capitées qui sont des trichomes sécréteurs (Perrin et Colson, 1986). Chez *Lavandula angustifolia* le calice est le site majeur de synthèse des monoterpènes avec une forte présence de glandes (Couderc-Le-Vaillant et Segur-Fantino, 1990 ; Guitton, 2010). Les constituants principaux de l'huile essentielle de la sous-espèce *Lavandula angustifolia* spp *angustifolia* ont été analysés comme étant l'acétate de linalyl et le linalol (Garcia-Vallejo, 1992 ; Guitton, 2010). Plus spécifiquement, d'autres études confirment la composition en ces constituants principaux à hauteur de 33 % de linalol, 18 % d'acétate de linalyl, 16 % d'acétate de lavandulyl, 7 % d' $\alpha$ -terpineol, et 5 % d'acétate de géranyl (Fakhari et al., 2005). Il existe d'autres sous espèces de *Lavandula angustifolia* telle *Lavandula angustifolia* spp *pyrenaica* dont l'huile essentielle est composée de linalol, borneol et camphre. Celle-ci diffère légèrement de celle produite par *Lavandula angustifolia* spp *angustifolia* (Guitton, 2010). Des triterpènes racinaires, 18-hydroxy-27-norolean-12,14-diène-30-al-28-oïque et 3 bêta-liydroxy-1-oxo-olean-12-ène-30-al-28-oïque, ont été analysés chez *Lavandula stoechas* (Topcu et al., 2001). D'après Kim et Lee (2002), la composition de l'huile essentielle varie en fonction de l'espèce, de l'individu, de l'environnement de culture, de la saison, de la région de culture et de la méthode d'extraction. En ce qui concerne le rendement de synthèse de ces huiles, Tsuru et al (2001) ont obtenu un rendement de 25 mg d'huile essentielle par gramme de biomasse chez *Lavandula angustifolia* mais des variations de rendement ont été notées entre différentes plantes filles issues d'une plante mère. En moyenne, 80 kg d'huile ha<sup>-1</sup> peuvent être produits pour une production de fleur moyenne de 3,5 t ha<sup>-1</sup>, soit un rendement de 23 mg.g<sup>-1</sup> de fleurs fraîches. Certains hybrides naturels, tel que le croisement entre *Lavandula latifolia*, et *Lavandula angustifolia*, ont une activité de synthèse d'huile plus importante. C'est le cas du lavandin, *Lavandula x intermedia*, qui produit une huile essentiellement à base de camphre (Guitton, 2010).

Le principal composant de l'huile essentielle de thym est un terpène phénolique, le thymol qui possède des propriétés bactéricides (Consentino et al., 1999; Skocibusic et al. 2006; Rota et al., 2007; Imelouane et al., 2009) et antioxydantes. La composition de ces huiles essentielles

varie en fonction des espèces de thym (Guillen et Manzanos, 1998; Sotomayor et al., 2004 ; Imelouane et al., 2009). La synthèse est donc génétiquement déterminée et des variations au sein d'une même espèce sont possibles (Ložienė et Venskutonis, 2005). Ainsi, *Thymus pulegioides* synthétise des composés ayant une action antibactérienne (Tekoriene et Loziene, 2012). Certaines publications répertorient le  $\gamma$ -terpinène (32 %), le thymol (26 %), le p-cymène (16 %) et le carvacrol (3 %) comme molécules principales des huiles (Blanco Salas et al., 2011). D'autres encore ont conclu que le carvacrol (50 à 63 %), le  $\gamma$ -terpinène (10 %) et le p-cymène (6 à 7 %) étaient synthétisés majoritairement avec un rendement de 1 % (% w/w) (Pavel et al. 2010). *Thymus serpyllum* produit une huile composée de  $\gamma$ -terpinène, p-cymène et thymol (Azar et al., 2010). La teneur en huile essentielle varie entre 0,6 et 4,4 ml kg<sup>-1</sup> en fonction de l'origine (Paavery et al., 2008), ce qui correspond à des rendements de production d'huiles proche de 1 % (% w/w) ( Paavery et al., 2008).

### 3.2.2 Chez les Astéracées

*Achillea millefolium* synthétise une huile dont les composés possèdent une activité antimicrobienne (Fazal et al., 2012). Les analyses effectuées sur plusieurs populations ont révélé d'importantes variabilités de synthèse (Orav et al. 2006 ; El Kalamouni, 2010) avec comme composants principaux le camphre (jusque 25 %),  $\alpha$  et  $\beta$ -thuyone (jusque 27 %), l'eucalyptol (jusque 20 %) et artemisia cétone (jusque 10 %). Des rendements de production d'huiles proche de 0,1 % (% w/w) ont été déterminés (Lourenco et al., 1999).

### 3.2.3 Chez les Ericacées

Des études d'inhibition de la germination de trèfles des prés ont été menées à l'aide d'extraits de bruyère vagabonde (*Erica vagans*) où 15 composés phénoliques ont été détectés (Ballester et al. 1982). Néanmoins, aucune étude n'a été réalisée par la suite afin d'identifier ces composants. Toutefois, des analyses complémentaires ont été réalisées sur une espèce proche, *E. australis* et ont conclu à la présence de dérivés phénoliques qui ont été identifiés dont l'acide protocatéchique, vanillique, p-hydroxybenzoïque, et p-coumarique (Arines, 1973 ; Carballeira et Cuervo, 1980; Ballester et al. 1982).

Des composés phénoliques ont été identifiés chez *Calluna vulgaris* dont l'acide phénolique, cinnamique, fumarique, citrique, silicique, la coumarine, des tanins, des flavonoïdes, l'arbutine, des flavonyl-glucides (quercitrine, myricitrine) (Mantilla, 1974 ; Ballester et al. 1982). Ces composés inhiberaient la germination de trèfles des prés (Ballester et al. 1982)

Tableau 9 : Caractéristiques écophysiological des plantes d'intérêt

Plantes	Huiles essentielles produites & Rendement de production	Racines et mycorhizes	Plantes facilitatrices	Croissance & Germination	Amendement	Particularités
<b><i>Lavandula angustifolia</i></b> (Lamiacées)	<b>Partie foliaire</b> Huile essentielle synthétisée essentiellement au sein des glandes peltées et capitées, calice  (Perrin et Colson, 1986 ; Couderc-Le-Vaillant et Segur-Fantino, 1990)	Racine pivotante Profondeur d'enracinement : 70 cm maxi  Mycorhizes à arbuscules ( <i>Glomus intraradices</i> )  (Sanchez-Castro et al., 2012)	<i>L. stoechas</i> (Ouahmane et al., 2006a; Duponnois et al., 2011)	Tailler les plants pour éviter la formation de bois  Germination en 2 à 4 semaines.  <i>L. angustifolia</i> Miller la plus étudiée	Acide gibbérellique (200 ppm) -> vitesse de croissance accrue (Chavagnat, 1978 Ruminska et al., 1978)  Germination et croissance en milieu salin favorisée (3 mg.l <sup>-1</sup> NaCl) (Liopa-Tsakalidi et al., 2011)	Stabilisation du sol si ruissellement (Burylo et al., 2012)  <i>L. angustifolia</i> : Tolérance aux milieux salés (5g.l <sup>-1</sup> ), accumulation Na <sup>+</sup> (Zollinger et al., 2007)
<b><i>Thymus pulegioides</i></b> (Lamiacées)	Thymol > para-cymène > linalol (De Martino et al., 2009)  Carvacrol>γ-terpinène>para-cymène (Pavel et al., 2010)  Rendement de 1% (Pavel et al., 2010)	Mycorhizes à arbuscules et vésicules, sur sites calaminaires perturbés (0,8% M.O.) et non perturbés (19,5% M.O.) (Pawlowska et al., 1996)	<i>Thymus satureoides</i> (Ouahmane et al., 2006)  Avec <i>A. millefolium</i> en milieu naturel (Grøndahl et Ehlers, 2008)			Forte capacité de couvre-sol  Résistance au piétinement élevée
<b><i>Thymus serpyllum</i></b> (Lamiacées)	γ-terpinène > p-cymène > thymol (Azar et al., 2010)  Rendement : 0,1- 0,6%	Mycorhizes à arbuscules et vésicules, sur sites calaminaires non perturbés (19,5% M.O.) (Pawlowska et al., 1996)	Avec <i>A. millefolium</i> en milieu naturel (Grøndahl et Ehlers, 2008)	Hauteur maximale de 10cm pour un diamètre de 50cm  Germination dépendante du taux d'humidité (0MPa, 90% de germination en 6 jours) (Abbad et al., 2011)		Forte capacité à couvrir le sol  Résistance au piétinement élevée

Plantes	Huiles essentielles produites & Rendement de production	Racines et mycorhizes	Plantes facilitatrices	Croissance & Germination	Amendement	Particularités
<b><i>Achillea millefolium</i></b> (Astéracées)	<b>Partie florale</b> Camphre > germacrène-D > (E)-nérolidol > sabinène > Trans-acétate de chrysanthélyle > 4-terpinéol > isocyclocitral > eucalyptol (El Kalamouni, 2010)					
	Plante pionnière (Pawlowska et al., 1996)	Camphre > $\alpha/\beta$ -thuyone > 1,8-cinéole > artémisia cétone (Orav et al., 2006)	Mycorhizes à arbuscules et vésicules (Pawlowska et al., 1996)		Plante à rhizome, d'où forte capacité couvre sol	
	Huile essentielle synthétisée au sein des fleurs	Monoterpènes : Sabinène, myrcène, B-pinène, cinéole Sesquiterpènes : germacrène-D, B-caryophyllène Cétones : thuyone, camphre (Guide de production sous régie biologique, 2009)	Racine pivotante		Un sol trop riche diminue la production de fleur	Résiste au piétinement
	Racines	Rendement : 0,05 -0,1 % (Lourenco et al., 1999)				
	<b>Partie racinaire</b> Sesquiterpènes racinaires : épi-cubénol > $\delta$ -élémente Monoterpènes racinaires : $\beta$ -pinène (Lourenco et al., 1999)					
<b><i>Calluna vulgaris</i></b> (Ericacées)	Acide phénolique, cinnamique, fumarique, citrique, silicique, la coumarine, des tanins, des flavonoïdes, l'arbutine, des flavonyl-glucides (Mantilla, 1974 ; Ballester et al., 1982)	Mycorhizes à éricoïdes				Trouvée sur sol calcaire (Grubb et Merrifield, 1969 ; Fuehner et Runge, 2009)
<b><i>Erica vagans</i></b> (Ericacées)	Acide protocatéchique, vanillique, p-hydroxybenzoïque, p-coumarique (Arines, 1973; Carballeira & Cuervo, 1980; Ballester et al., 1982)					

Rendement : Rendement de production maximal d'huiles (% w/w) – M.O. : Matière Organique

#### 4 Développement des plantes d'intérêt sur l'argilite

Parmi les plantes produisant les antioxydants et répondant aux contraintes édaphiques des verses d'argilite, seuls la lavande et le thym ont été retenus pour effectuer des tests de germination et croissance. Plusieurs essais de germination et de culture ont été réalisés à la fois sur du COx frais et du COx âgé, i.e. stocké depuis 10 ans à l'air libre et donc fortement oxydé. Il s'agissait de comparer leur croissance sur l'argilite avec des plantes modèles de laboratoire (i.e. luzerne et ray-grass) afin d'affiner nos choix techniques pour l'étude *in situ*. Pour suivre le développement racinaire au sein du COx, des observations par tomographie X à haute résolution ont été réalisées.

Un premier essai de germination sur du COx frais ou âgé a été réalisé avec le thym (*Thymus serpyllum*) et les deux plantes modèles de laboratoire (luzerne et ray-grass) afin de préciser les conditions optimales de germination et les temps croissance des plantules (Figure 22). Ces essais ont été réalisés dans des petits pots (piluliers percés en polypropylène de diamètre 35 mm, Chapitre II-§6.1) adaptés à une analyse directe par le micro-tomographe X (Chapitre II-§ 11.3). Sur COx frais et âgé, la luzerne a germé 2 jours après le semis. Pour le thym, la germination a eu lieu 8 jours après le semis sur COx frais et 5 jours après le semis sur COx âgé. Cependant après 30 jours, les plantules de thym, relativement chétives, n'ont pas résisté (100% de mortalité). En raison d'un développement racinaire moins dense du ray-grass par rapport à la luzerne, les analyses en tomographie X ont été réalisées uniquement sur la luzerne (Figure 23). Les racines de ray-grass étaient trop fines pour générer un contraste suffisant sous rayons X et être localisées par le tomographe. Les sections et reconstitutions en trois dimensions obtenues par tomographie X donnent des indications sur le cheminement des racines dans l'argilite du COx (Figure 23). Malgré une forte compacité marquée par l'absence de vides (en noirs), les racines pivotantes de la luzerne (en bleu) colonisent en profondeur l'argilite (en gris). Le coefficient d'absorption X important des sulfures permet aussi d'apprécier leur distribution (points brillants et orange) au sein de matrice argileuse (en gris) et la diversité granulométrique des agrégats pyriteux. Leur taille varie de quelques millimètres lorsqu'ils sont associés à des microfossiles (petites ammonites et framboïdes), à moins d'un micron pour les petits tourillons pyriteux.



Figure 22: Culture de thym (*Thymus serpyllum*) à gauche et de luzerne (*Medicago sativa*) à droite sur de l'argilite fraîche (en bas) et âgée (en haut) 5 jours après germination en chambre de culture

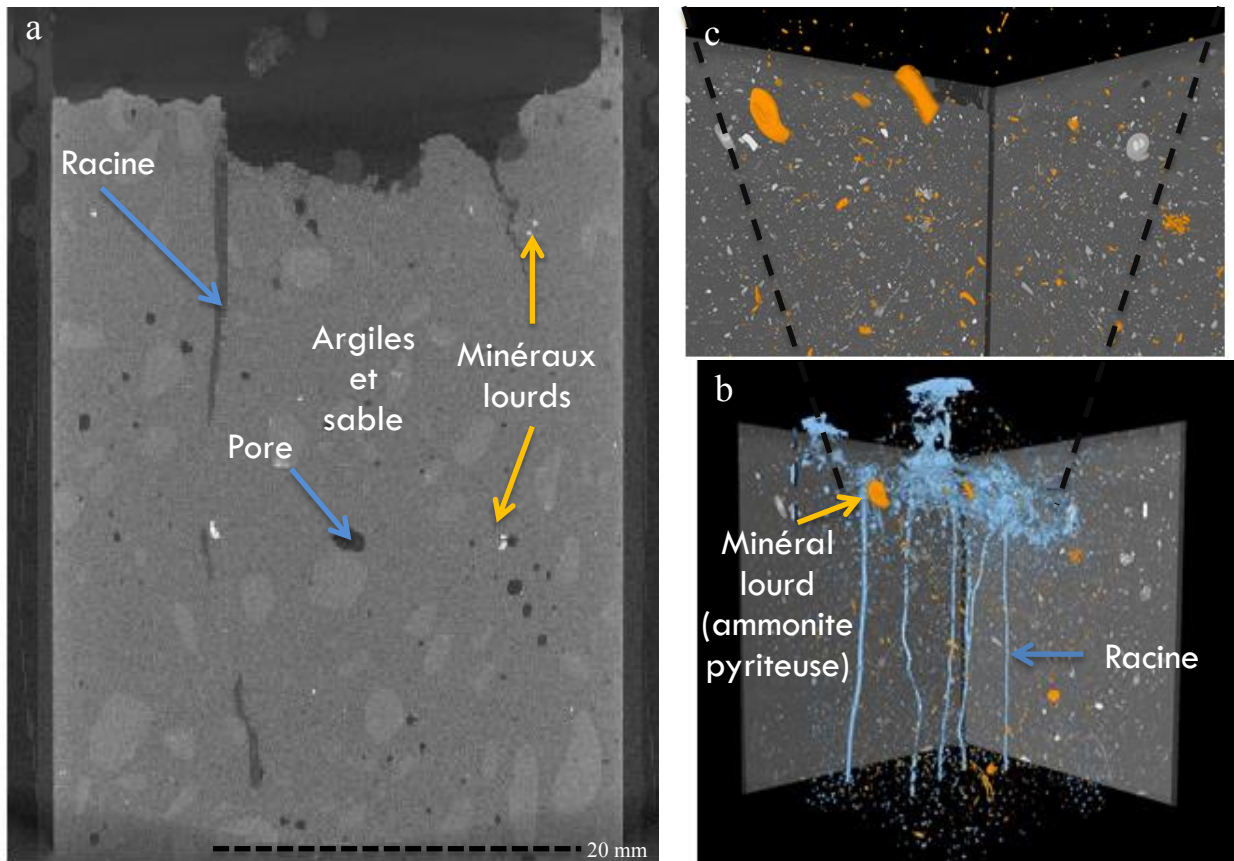


Figure 23 : Observation et reconstruction en tomographie X de racines de luzerne au sein de l'argilite 26 jours après germination. (a) Section longitudinale– Le niveau de gris est inversement proportionnel à la densité des corp ; (b) Reconstruction volumétrique après seuillage et segmentation des racines pivotantes de luzerne (bleue); (c) Répartition tridimensionnelle des pyrites (orange). Diamètre = 35 mm

Un deuxième essai de germination sur COx frais et âgé a été réalisé avec la lavande (*Lavandula angustifolia*) et le thym (*Thymus serpyllum*). Ce deuxième test a confirmé, pour le

thym, des temps de germination assez longs et une mortalité précoce des plantules. Pour les graines de lavande un temps de germination de 38 jours a été observé sur le COx âgé. Le taux de germination faible (6 %), et un taux de mortalité important des plantules sur COx âgé n'a pas permis de réaliser des tomographies racinaires. Sur le COx frais, aucune germination n'a été observée.

Afin de lever la dormance des graines de lavandes et favoriser leur germination dans l'argilite, les graines ont été vernalisées dans un premier temps. Dans un second temps, les graines vernalisées ont été prétraitées avec l'acide gibbérellique (Chapitre II-§6.1). Avec ces prétraitements, les taux de germination ont considérablement augmenté : plus de 60% en boîte humide après 7 jours pour les graines de lavandes vernalisées et prétraitées à 200 mg.l<sup>-1</sup>. Sur le COx frais et âgé, on obtient les mêmes taux de germination avec un prétraitement à l'acide gibbérellique à 300 mg.l<sup>-1</sup>. En revanche, pour les graines de lavandes vernalisées sans prétraitement à l'acide gibbérellique, les taux de germination obtenus après 10 jours sont inférieurs à 10 %. Des résultats similaires ont été obtenus sur les dispositifs témoins sans COx (Figure 25).



Figure 24 : *Lavandula angustifolia* vernalisée sur COx âgé (à gauche) et prétraitées avec 200 mg.l<sup>-1</sup> d'acide gibbérellique sur COx frais et âgé (à droite) à 14 jours et 9 jours après semis respectivement



Figure 25 : Graines de *Lavandula angustifolia* vernalisées et imbibées pendant 7 h avec de l'eau osmosée (à droite), 100 mg.l<sup>-1</sup> d'acide gibbérellique (au milieu), 300 mg.l<sup>-1</sup> d'acide gibbérellique (à gauche) 7 jours après semis

L'observation par tomographie X du développement racinaire des lavandes dans du COx frais a été réalisée à 50 jours de culture, sans succès. La colonisation racinaire n'a pas pu être estimée en raison de l'absence d'un contraste suffisant entre les racines et l'argilite (résultats non présentés). Après 145 jours de culture, une nouvelle série de sections longitudinales contrastées montre, cette fois-ci, un développement des racines de lavande au sein du COx frais (Figure 26). Dans la section présentée, la racine de lavande (gris foncé) colonise un ensemble très poreux formé de blocs argileux grossiers (en gris clair) et de pores (en noir). Les minéraux lourds (figurés en blanc) sont dispersés au sein des agrégats argileux. La racine exploite les anfractuosités submillimétriques pour se développer en profondeur jusqu'à la couche drainante sableuse sable de Fontainebleau. La reconstruction en trois dimensions montre le déploiement de la chevelure racinaire au sein de l'argilite (Figure 27). Comme précédemment, après segmentation et seuillage par le logiciel Avizo©, les racines sont représentées en bleu. Toutefois, le seuillage en densité sélectionné ne sépare pas complètement les bulles d'air présentes dans la porosité, des composants racinaires. Néanmoins, si on tient compte uniquement des éléments contigus, on note la présence d'une racine principale en pivot, caractéristique de la lavande. Le système racinaire est très ramifié et colonise l'ensemble du volume avec de nombreuses racines secondaires autour de la racine pivot.



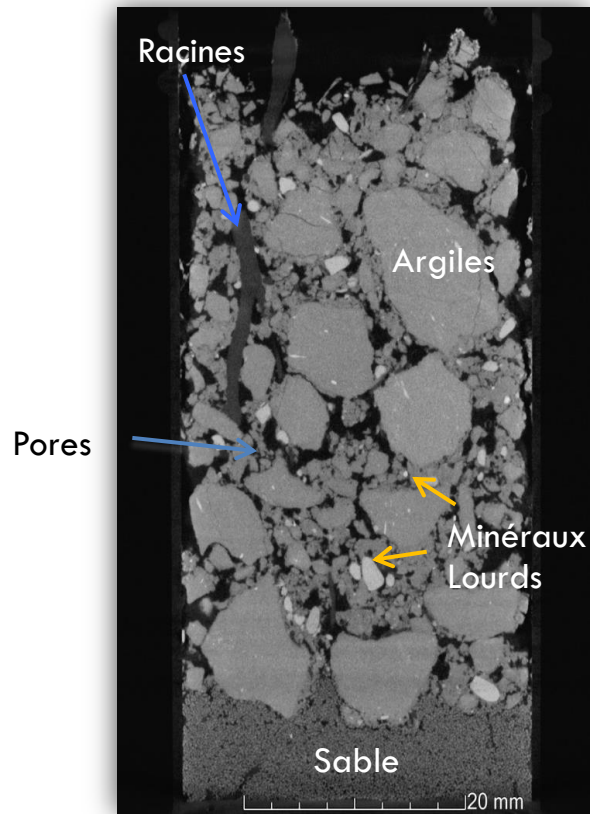


Figure 26: Section longitudinale par tomographie X d'un pot d'argilite planté - Lavande germée et cultivée pendant 145 jours sur COx frais

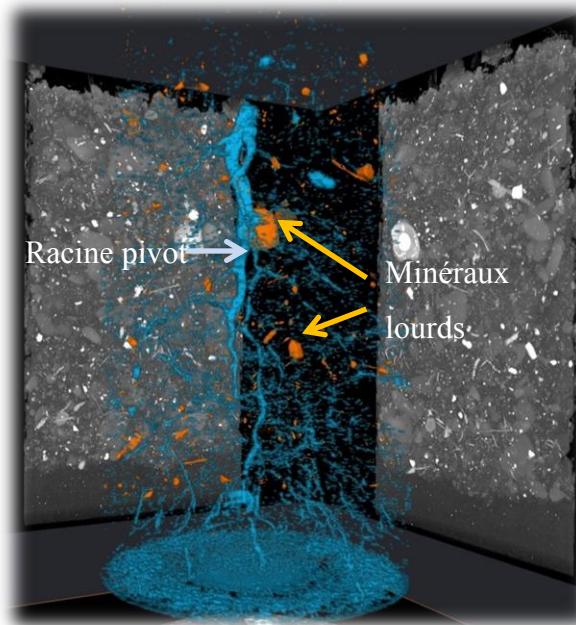


Figure 27: Représentation tomographique en trois dimensions de l'évolution des racines d'une lavande cultivée pendant 145 jours sur le COx frais: Orange: éléments pyriteux; Bleu: racines et bulles d'air

La reconstruction 3D indique la dispersion assez homogène des grains de sulfures autour du faisceau racinaire. Leur contact est très intime et les courtes distances sont favorables aux interactions entre les sulfures et la rhizosphère. Ainsi, la lavande après un prétraitement approprié à l'acide gibbérellique se développe sur le COx de manière « harmonieuse » ; son système racinaire colonise rapidement l'ensemble du volume argileux disponible sans montrer un quelconque évitement des zones riches en sulfures.

C'est en raison de ce caractère robuste, que la lavande a été retenue pour la suite de ce travail et surtout pour réaliser les tests *in situ*.

## 5 Conclusion

Pour limiter l'altération minérale du substrat, des composés antioxydants d'origine végétale ont été ciblés pour leur rôle potentiel sur l'inhibition de l'altération minérale électrochimique et microbienne (e.g. sulfures, argiles, ...) sans présenter de forte toxicité environnementale. Nous avons pu identifier une cohorte de molécules et de plantes d'intérêt pour la phytostabilisation d'un substrat à l'affleurement ou anthropisé tel que le COx. Parmi ces molécules, trois d'entre elles, **le linalol, le thymol et le carvacrol ont été choisies, qui répondaient aux critères de sélection établis**. Toutes ces molécules sont des composés naturels, synthétisés au sein de parties aériennes de diverses plantes, et ont été ciblées pour leurs capacités antioxydantes, antimicrobiennes et antifongiques, et pour leur innocuité environnementale. Cependant, seul le thymol a déjà fait l'objet de quelques publications sur l'étude de la régulation électrochimique et microbienne de sulfures de fer. Mustin (1992), Mustin et al. (1992), Mustin et al. (1993), Meline et al. (1996) ont ainsi mis en évidence l'inhibition de l'altération électrochimique et microbienne de la pyrite en présence de thymol. En outre, ces expériences ont mis en évidence l'inhibition de l'altération minérale dans des conditions simplifiées par l'utilisation d'un seul minéral pyriteux, et non pas une matrice complexe argileuse.

Les résultats de recherche sur les plantes d'intérêt potentiel dans un contexte de phytostabilisation du COx, et les essais de germination et de culture en laboratoire, ont permis de cibler la **lavande (*Lavandula angustifolia*)** et le **lavandin (*Lavandula x intermedia* « *grosso* »)** de la famille botanique des **Lamiacées** qui possède toutes les qualités requises pour s'accommoder des contraintes climatiques et édaphiques du site de stockage, produire des composés antioxydants de façon pérenne, et établir son cycle de végétalisation complet. Sierra et al. (2012) ont ainsi étudié la lavande afin de stabiliser le sol d'une ancienne mine de mercure. Les auteurs ont ainsi mis en évidence un comportement d'exclusion racinaire du

mercure et une diminution de la lixiviation de calcium, magnésium, sulfates et chlore au sein d'échantillons de sol rhizosphérique de lavandes par rapport au sol non rhizosphérique. Durán Zuazo et al., (2008) ont également étudié l'impact de plusieurs espèces végétales, dont la lavande laineuse (*Lavandula lanata*), sur l'érosion d'un sol semi-aride et les écoulements d'eau en fonction de la taille des coupes des parties aériennes effectuées sur une période de 4 ans. Ainsi, l'implantation d'un couvert végétal de lavande laineuse tend à réguler l'érosion du sol et s'avère être le couvert végétal le plus judicieux avec des productions de biomasses et d'huile essentielle constantes en fonction des différentes coupes des parties aériennes.

Les essais de germination réalisés sur le COx frais et âgé ont mis en évidence la capacité de germination et de développement de la lavande sur ce type de substrat très argileux et riche en sels solubles. Une amélioration sensible des taux de germination et des taux de mortalité plus faibles ont été observés avec l'utilisation d'acide gibbérellique. Cette hormone de croissance améliore ainsi le taux de germination, accélère le temps de germination et la robustesse des plantes et pourrait aussi améliorer la tolérance des plantules de lavande à la sécheresse ou à la salinité du COx, riches en éléments alcalins (Na, K, Sr...). Les observations réalisées en tomographie X, ont confirmé l'établissement et le maintien d'une racine pivot des plants de lavandes, donc un bon développement racinaire, dans le COx frais peu compacté. Un COx trop compacté pourrait, en revanche, conduire à un système racinaire atrophié avec des racines de plus faible diamètre et moins nombreuses voire l'absence de racine pivot, comme certaines études l'ont montré dans des sols sylvicoles très compactés suite à la mécanisation des travaux (Ranger et al., 2012). Si les résultats obtenus sur des courtes durées au laboratoire étaient encourageants quant à la capacité de la lavande à germer et se développer sur le COx, des essais *in situ* à moyen et long terme étaient nécessaires. Les résistances des plantes et plantules *in situ* n'étaient pas acquises. Par ailleurs, la production *in situ* de molécules antioxydantes par la lavande (parties aériennes, fleurs ou racines), et leur impact sur l'altération du COx restait à étudier.



Chapitre IV. Évolution physico-chimique et microbiologique  
de l'argilite en présence de composés aromatiques  
antioxydants d'origine végétale

---



Dans un contexte expérimental de végétalisation du COx, le chapitre précédent a permis de sélectionner des plantes d'intérêt potentiel de la famille des *Lamiaceae*, la lavande (*Lavandula angustifolia*) et le lavandin (*Lavandula x intermedia* « *grosso* ») pour la végétalisation des verses ainsi que des composés antioxydants produits par ces espèces végétales, le thymol, le linalol et le carvacrol. Des expériences en laboratoire ont montré la germination des graines de lavandes et un développement homogène des racinaires sans évitement des minéraux denses pyriteux du COx riches en sulfures.

Au sein de ce chapitre IV, nous avons évalué l'effet de ces composés antioxydants sur les processus d'altération physico-chimique et microbiologique du COx. Pour cela, des expériences ont été réalisées avec des dispositifs simplifiés contenant un échantillon de COx qui a été lixivié par des solutions contenant des antioxydants. Dans un premier temps, l'effet de l'ajout de composés antioxydants d'origine végétale en solution sur les processus d'altération physico-chimique du COx fraîchement excavé (i.e. frais) a été étudié. Cette première expérience d'incubation a été réalisée pendant deux mois dans des conditions contrôlées. Le COx a été lessivé artificiellement avec trois concentrations de trois composés antioxydants (linalol, thymol et carvacrol). Les transformations physico-chimiques des échantillons de COx ont été évaluées par la quantification des ions et oxyanions des lixiviats et par des mesures de spectrométrie Infrarouge.

Dans un deuxième temps, pour prendre en compte les interactions entre les antioxydants et les microorganismes, nous avons évalué l'effet de l'ajout d'antioxydants sur le COx inoculé par des microorganismes et amendé avec une source de carbone, favorisant leur développement. Cette incubation avait pour objectif d'étudier l'effet des antioxydants d'origine végétale sur les processus d'altération physico-chimiques et biologiques du COx frais. Cette deuxième expérience d'incubation a été réalisée sur une période de 3 mois en conditions contrôlées à 28°C. Pour confirmer l'hypothèse que l'altération du COx était liée à l'oxydation de la pyrite, un enrichissement en pyrite a été réalisé sur certains échantillons de COx. La présence des plantes a été simulée par l'ajout d'antioxydants, le thymol et le linalol, qui avaient montré des résultats significatifs lors de la première expérience, et par des apports d'exsudats racinaires synthétiques, représentant une source de carbone pour les microorganismes. Les transformations physico-chimiques et microbiologiques du COx ont été évaluées en quantifiant la lixiviation des anions et des cations. Le développement microbien a été estimé par extraction d'ADN du COx suivie d'une quantification du nombre de copies de gènes d'ADNr 16S et 18S. L'analyse des acides organiques produits a permis d'estimer l'activité

microbienne et de relier cette activité à l'évolution du pH du milieu et à la lixiviation des éléments minéraux du CO<sub>x</sub>. Seul le thymol a montré des résultats significatifs dans cette expérience. C'est pour cette raison que les résultats présentés portent uniquement sur ce composé. Les résultats concernant les ajouts de linalol sont présentés en annexe.



## 1 Impact des composés antioxydants sur la lixiviation des éléments du COx

### **Antioxidant plant metabolites affect mineral element leaching from Callovo-Oxfordian clays**

Dimitri Ubersfeld<sup>1,2</sup>, Corinne Leyval<sup>1,2</sup>, Paul-Olivier Redon<sup>3</sup>, Christian Mustin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Université de Lorraine, LIEC, Faculty of Sciences and Technology, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France*

<sup>2</sup> *CNRS, LIEC, Faculty of Sciences and Technology, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France*

<sup>3</sup> *Andra, R&D Division, Route départementale 960 – BP 9, 55290 Bure, France*

#### 1.1 Introduction

In soils, biological activity promotes organic matter degradation and mineral weathering. In the early stages of pedogenesis, element cycling and transformation are intimately related to the concomitant contribution of plant activity and microbial activity to rock weathering (Leyval & Joner, 2001). In the past three decades, a large number of investigations has demonstrated that microorganisms, i.e. bacteria and fungi, play a role in mineral transformation processes (mineralization and weathering), and have a significant influence on plant nutrition via their effects on element transformation in the rhizosphere (Barker et al., 1998). Plant roots release carbon exudates, organic residues and nutrient compounds that can be used for microbial growth and metabolism. Produced or excreted metabolites such as protons, organic acids, quinones or siderophores cause pH and redox potential modifications and promote element mobility (Hinsinger, 1998; Marschner, 2012). As a consequence, they can accelerate element release from mineral lattices and contribute to the acquisition of limiting nutrients such as iron, sulphur, and phosphorus (Ferret et al., 2014). Thus, from a biogeochemical point of view, biologically mediated mineral dissolution can be considered as an indirect consequence of plant and microbial metabolisms and of complex interactions between roots, microbiota, and soil components. On the other hand, mineral weathering could be described as a specific strategy that gives a competitive advantage to plant-microorganism associations for colonizing pristine raw materials such as silicated and clayed substrata.

Clay materials commonly consist of a mixture of various aluminosilicates such as illite, mixed-layer illite/smectite, and iron- or sulphur-rich minerals such as pyrite, siderite, dolomite, and iron oxyhydroxides (Gaucher *et al.*, 2004; Esnault *et al.*, 2013). A large range of biological and chemical mechanisms could be involved in metal mobilization and clay particle weathering (Mustin *et al.*, 1992; Kostka *et al.*, 2002b) and lead to sulphate, iron, calcium and magnesium leaching (Esnault *et al.*, 2013).

Acidic oxidation of sulphide minerals is favorable to carbonate (i.e. calcite, dolomite, siderite) or phyllosilicate (e.g. smectite) acid dissolution in natural soils (Hersman *et al.*, 1995). Furthermore, ferric ion reduction by bacteria may destabilize clay structure (Lantenois *et al.*, 2005) and cause calcium and magnesium leaching. These elements (e.g. iron, sulphates, calcium, and magnesium) can precipitate to form secondary minerals such as gypsum, jarosite, and goethite (Charpentier *et al.*, 2001). Mineral weathering, mineral element leaching, and secondary mineral phases can alter clay physical and chemical properties and result in a substantial release of sulphide and iron into natural ecosystems (Taylor *et al.*, 1984). In the context of excavation or shallow soils and natural outcrops, clay materials can be exposed to the influence of plants and their exudates and metabolites.

The numerous studies on the impact of the metabolic activity of microorganisms on soil mineral weathering demonstrate the influence of both mineral properties and environmental parameters (i.e. quality and availability of carbon sources) on the biodissolution rates and weathering mechanisms of silicate and clay minerals (Hutchens *et al.*, 2008). In clayed rocks, due to low water activity and limitation in nutrient and energetic sources, bacteria are usually found in very low densities, less than  $10^3$  cells per gram (Stroes-Gascoyne *et al.*, 2007). However, clay mineral-bound Fe(III) was found able to sustain the growth of iron-reducing bacterial consortia (IRB) isolated from rice paddy soil or subsurface sediment (Kostka *et al.*, 2002b). Moreover, weathering efficiency depends on the availability of structural Fe(III) in clay minerals (Lantenois *et al.*, 2005; Esnault *et al.*, 2013). In this biogeochemical context, colonization of clay substrates by plant roots could provide nutrients, water and carbon sources able to stimulate the activity of autochthonous microorganisms as well as the establishment of allochthonous bacterial communities.

Many plants have a great antioxidant potential, therefore phenolic substances could also play a role in mineral transformation processes (mineralization and weathering). Aromatic substances, like humic acids or thymol, may limit physicochemical and biological mineral weathering (e.g. pyrite weathering) by reducing electrochemical and microbiological interactions (Mustin *et al.*, 1992; Meline *et al.*, 1996; Perdicakis *et al.*, 2001). Antioxidant

compounds such as tannins may decrease mineral alteration rates and bacterial growth (Hagerman *et al.*, 1998; Kraus *et al.*, 2003). Anthony *et al.* (2012) studied forty-eight different botanical families for their antioxidant activity as free radical-scavenging compounds. Essential oils from the *Lamiaceae* family were the most effective antioxidants. Thymol, carvacrol and linalool were the most abundant compounds in the essential oils from this family. However, despite abundant literature about soil mineral weathering, the effect of antioxidants on bacterial and electrochemical oxidation processes is still poorly understood. We hypothesized that biologically-produced antioxidant compounds might reduce clay weathering. To test this hypothesis, we assessed the effect of water leaching and of the addition of biological antioxidant compounds on the physical and chemical characteristics of clay material. An experiment was conducted for 2 months under controlled conditions with Callovo-Oxfordian clay (COx), artificially leached with 3 concentrations of antioxidant compounds. Three antioxidants, linalool, thymol and carvacrol, were selected for their well-known antioxidant properties (Ložienė & Venskutonis, 2005; Lee *et al.*, 2005). COx alteration was assessed by measuring element leaching (chlorine; sulphates; phosphates; nitrates) and pH evolution at each sampling time. The experiment was conducted under abiotic conditions.

## 1.2 *Materials and Methods*

### 1.2.1 *Clay samples*

We used clay rock excavated in June 2013 from the Andra Underground Research Laboratory (URL) at Bure (France), in the eastern part of the Paris Basin. The laboratory was built to investigate the disposal of radioactive wastes in a deep clayey formation (Andra, 2005). The mineralogy and geochemistry of this Callovian-Oxfordian geological formation has been extensively documented (Gaucher *et al.*, 2004).

The mineralogy, composition, and granulometric analysis of the samples are shown in Table 10. The mineralogical composition of COx claystone depends on depth, with significant changes in carbonate and clay contents. Mean composition was 40 % clay (mainly interstratified illite/smectite), 20 % quartz, 30 % carbonate (mainly calcite), 5 % feldspar, less than 2 % pyrite, and 2 % of low mature organic materials. The sample was ground and sieved to keep the 2- to 3-mm fraction.

Table 10 : Chemical composition and reactivity of COx, specific area of 42.5 to 45 m<sup>2</sup>. g<sup>-1</sup> was determined by nitrogen BET analysis (values are the means of 8 replicates)

	> 1	0.14%
	0.280 - 1	0.09%
	0.210 - 0.280	0.05%
	0.125 - 0.210	1.04%
<b>Granulometric classes (mm)</b>	0.1 - 0.125	0.58%
	0.08 - 0.1	0.56%
	0.063 - 0.08	0.75%
	0.05 - 0.063	1.60%
	0.025 - 0.05	7.06%
	0.008 - 0.025	44.62%
	< 0.008	43.51%
	Clay	25 - 60 %
Quartz	25 - 35 %	
Carbonate	15 - 50 %	
Pyrites	1 - 2%	
Organic matter	1 - 2 %	
pH	8.7	
	mmol g <sup>-1</sup> COx	μmol g <sup>-1</sup> COx
<b>Element composition</b>	Si 17± 0.25	S 260.5± 13.83
	Al 9.7± 0.13	
	Ca 2.7± 0.11	Na 49.5± 1.93
	Fe 1.9± 0.53	
	Mg 1± 0.02	P 8.1± 22.83
	K 0.4± 0.01	
	Ti 0± 0.05	Mn 0.7± 1.93

### 1.2.2 Antioxidant solutions

Antioxidant compounds were linalool (154 g.mol<sup>-1</sup>, ref: 101220791, Sigma), carvacrol (150 g.mol<sup>-1</sup>, ref: 101247500, Sigma), and thymol (150 g.mol<sup>-1</sup>, ref: 16254, Sigma). For each compound, three solutions (pH 6.5) were prepared at concentrations of 2, 40, and 80 mg.l<sup>-1</sup> diluted in deionized water for immediate use.

### 1.2.3 Experimental setup

Experimental devices consisted of column-like units based on a sterile vacuum filtration system (acetate cellulose filter, pore size 0.45 μm, Nalgene® ref: 734-5064, VWR) equipped with a 250-ml upper receiver. A supplementary glass fiber pre-filter (pore size 1.5 μm) covered the filtration membrane to prevent clogging by clay particles. An aseptic glass bottle (Schott 150 ml) was placed right underneath the filtration system to collect leachates. The upper receivers were filled with a single layer of clay material (10 g) and leached with 200 ml of each antioxidant solution at three concentrations (linalool, thymol or carvacrol at 2, 40, or 80 mg.l<sup>-1</sup>), or deionized water for the controls (imbibition step, S1). After 24 hours, the filtered leachates were collected in the vials. Each COx-layered sample was then watered once a week with 50 ml of deionized water (leaching step, S2). After 2 hours of contact, leachates were collected with a vacuum pump for thirty minutes. Evaporation was estimated from the loss of weight in the receiver. The leaching experiment design included three

replicates at each concentration, hence a total of 30 experimental units. The experimental devices were kept in a controlled chamber for 57 days to induce imbibition-desiccation cycles (40 % hygrometry, 18°C/23°C night/day temperatures).

#### *Chemical analysis*

Prior to chemical analysis, the pH of each leachate was measured under an aseptic sterile atmosphere (Meterlab PHM250), before filtration at 0.22 µm and storage in a dark room at 4°C. Anion concentrations (sulphate, chlorides, phosphate, and nitrate) were measured on a Dionex ICS-3000 ion chromatography system (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA). Isocratic separations of  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , and  $\text{PO}_4^{3-}$  were carried out using a polymeric surface-sulfonated analytical column (AS20, 4 mm x 50 mm) and a conductimetric detector. A reagent-free eluent generator (EGC II - KOH cartridge) was used to generate a potassium hydroxide eluent gradient at a flow-rate of 1 ml/min. The IC system was fitted with a 25-µl loop and an autosampler for sample processing. System control and post-run analysis were performed with Chromeleon® software (version 6.80, Dionex). The quantification limit for all analyses was 50 µg.l<sup>-1</sup> with an uncertainty of 60% according to the norm NF T 90-210.

#### *1.2.4 Microbiological analyses*

The presence of indigenous bacteria in the freshly ground clay sample was investigated by counting, using the Most Probable Number (MPN) method. Ten-fold dilutions of a COx suspension (10 g /100 ml) ranging from 1 to 10<sup>-8</sup> were prepared in 96-well microplates. The culture medium (200 µl of Luria Bertani per well) was inoculated with 20 µl of the COx suspension dilutions. Optical density at 620 nm was used to monitor bacterial cell numbers in each microplate well (Safas Xenius FLX, Monaco). After a 48h incubation at 28°C, the wells scored as positive were determined as compared to the blanks ( $\Delta\text{OD}_{620\text{nm}} > 0.1$ ). Most probable numbers of cells were estimated using MPN toolbox software, Version 4.04 (USA EPA).

#### *1.2.5 Infrared spectroscopy*

Transmission mid-infrared spectra were recorded on a Fourier transform Infrared spectrometer equipped with a DTGS detector (FTIR Vector 22, Bruker). Sample discs were prepared with 200 mg of dry KBr powder (Sigma Aldrich 221864) and 1.5 mg of finely ground and dried COx sample, after imbibition step with or without antioxidant addition (80 mg.l<sup>-1</sup>). At a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>, 50 scans were made throughout the range of 4000 and 400

cm<sup>-1</sup>. The absorbance of pure KBr, used as a nonabsorbing reference powder, was measured under the same conditions. Spectra are reported in absorbance units.

### 1.2.6 Data analysis

To study the volume-dependent leaching of species from COx samples, first-order kinetic model was used from the leaching step (S2). This model proceeds at a rate that depends linearly on the amount of a given element. The differential equation describing first-order kinetics is:

$$r = d [M] / dV = - k [M]^n \quad n = 1$$

where, M is the amount of anions leached ( $\mu\text{M}$  per gram of COx claystone), V is the reaction volume, i.e the percolated volume (ml), r the reaction rate ( $\mu\text{mol.ml}^{-1}$ ), and K the first-order rate constant ( $\text{ml}^{-1}$ ). The units can vary with other order reactions. The cumulative concentrations of inorganic anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) as a function of volume were characterized by the following exponential first-order equation:

$$Q_M = Q_{\max}(1 - e^{-kV}),$$

where  $Q_M$  is the amount of anions leached ( $\mu\text{M}$  per gram of COx claystone), and  $Q_{\max}$  is the maximum leachable quantity of anions.  $Q_{\max}$  corresponds to an asymptotic value of  $Q_M$  for an infinite cumulated volume.  $Q_{\max}$  depends on the total quantity and the availability of each element in COx.

Normality was tested using Shapiro-Wilk's test, and then comparisons among treatments for each parameter were made using one-way or two-way ANOVA followed by Fisher's LSD test to compare differences among multiple groups at the significance level  $p = 0.05$ . For percentage data, values were arcsine-transformed before statistical tests. XLStat Software (version 2012.6.01) was used for data processing.

## 1.3 Results

The MPN count technique did not evidence any bacterial development in the freshly ground COx sample. From day 2 to day 30, no significant difference in the quantity of absorbed water was noted between the antioxidant-amended and control columns (Figure 28). After 30 days of incubation, COx treated with thymol at 40 and 80  $\text{mg.l}^{-1}$  tended to display the highest cumulated quantity of absorbed water as compared to the other antioxidant-amended and control treatments, but the difference was not significant. Cracks caused by COx hydration and swelling were observed following the drying/wetting cycles.

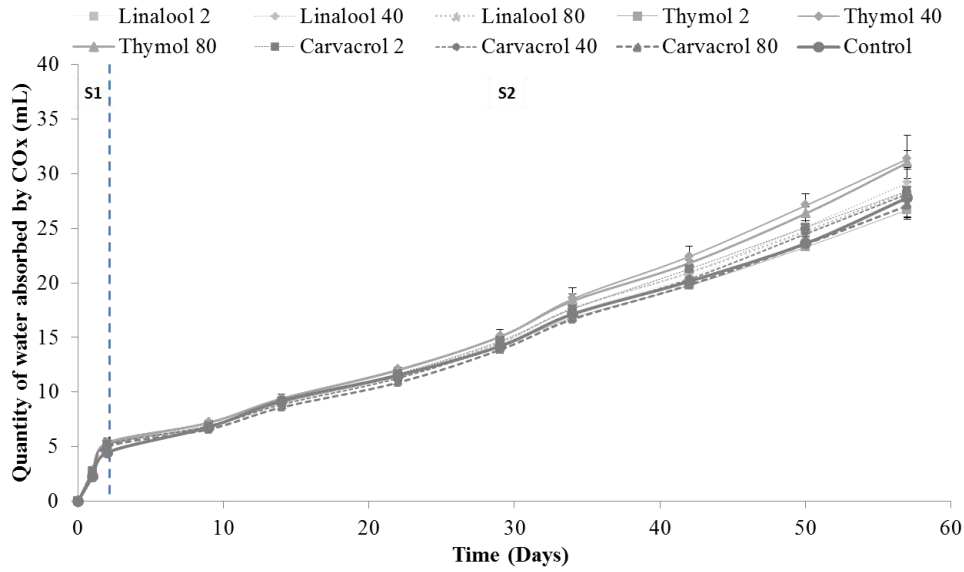


Figure 28: Cumulated quantities of water absorbed by COx (ml) amended with linalool, thymol or carvacrol at three different concentrations (2, 40, and 80 mg.l<sup>-1</sup>) and non-amended (control) for 57 days. Means ± standard deviations (n=3). Step 1 (S1) corresponds to antioxidant input. Step 2 (S2) corresponds to weekly water leaching.

Whatever the antioxidant input, changes in pH and anion leaching rates followed two main steps (S1 and S2) during the imbibition and leaching cycles, respectively. For each treatment, pH values decreased slightly from 6.6 to 6.2 (average values) during imbibition step S1 (Figure 29). From day 2 until the end of the experiment (step S2) and whatever the antioxidant-amended or control treatments, leachate pH increased significantly from 6.2 to 7.1, but remained below the initial pH value (8.7). On day 57, no significant difference was noted between control and amended COx leachates, whatever the antioxidant and its concentration.

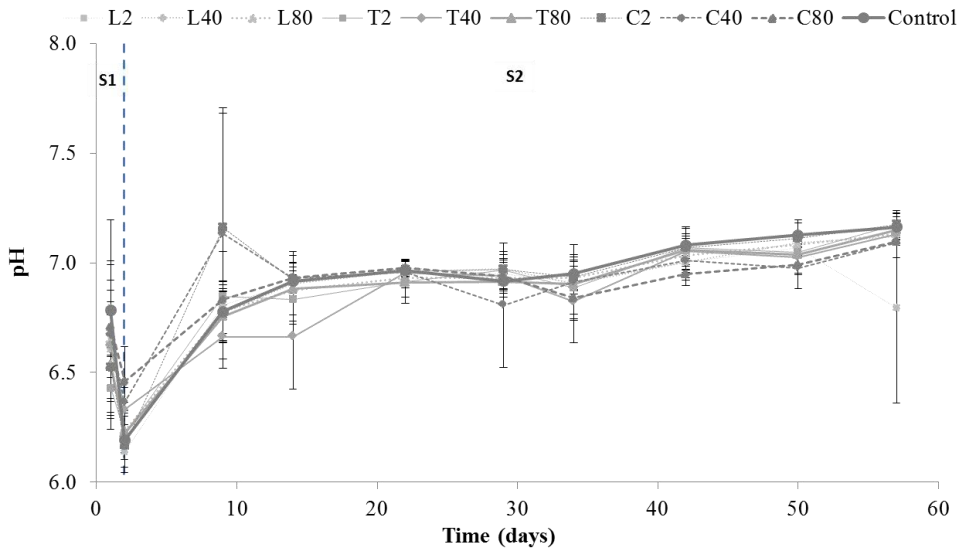


Figure 29: Evolution of pH values in leachates over time, with COx amended with linalool (L), thymol (T), or carvacrol (C) at three different concentrations (2, 40, and 80 mg.l<sup>-1</sup>) and non-amended (control), Means  $\pm$  standard deviations (n=3).

For each antioxidant, concentration and replicate, chloride, nitrate, sulphate, and phosphate leaching rate constants (k) and maximum values (Q<sub>max</sub>) were estimated by regression of cumulative leaching trends according to a first-order kinetic model (Figure 30). We assumed that leaching rates were directly proportional to available amounts in COx. Q<sub>max</sub> was then an asymptotic and extrapolated value of the maximum leachable quantity of elements (i.e. for an infinite volume).

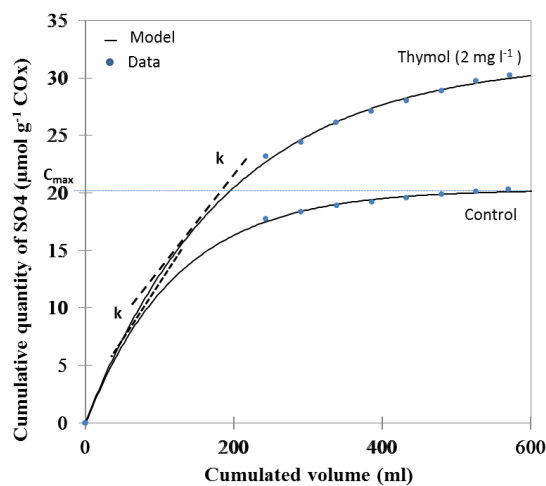


Figure 30: Cumulative quantities of SO<sub>4</sub> (µmol.g<sup>-1</sup> COx) based on cumulated volumes (ml). Blue circles, experimental data; continuous lines, first-order kinetic model curves for thymol at 2 mg.l<sup>-1</sup> and control (n=1).

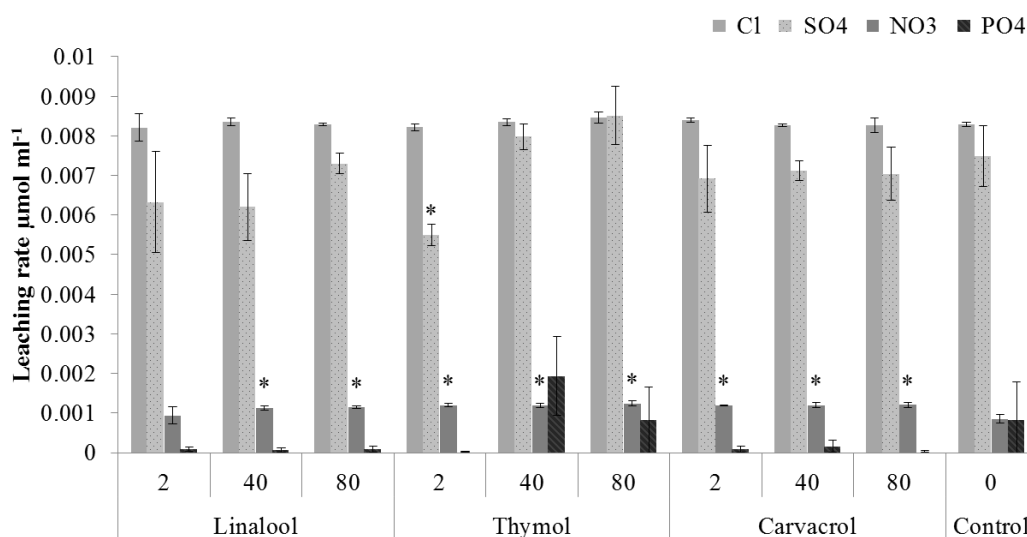


The use of first-order kinetic models for data fitting was validated. Correlation coefficients were close to 0.99, except for phosphorus (0.96), and sums of squares of deviations were close to 0 (Table 11). Subsequently, leached and cumulated quantities (Q) of chloride, nitrate, sulphate, and phosphate were correctly estimated by the models over the entire desiccation-imbibition cycle. The first-order kinetic model allowed us to determine two parameters: the reaction rate  $k$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), and maximum anion concentration  $Q_{\text{max}}$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Table 11: Correlation coefficient ( $R^2$ ) and sum of squares of the deviation between modeled values and measured values of cumulated leached quantities of chloride (Cl), nitrate ( $\text{NO}_3$ ), sulphate ( $\text{SO}_4$ ), and phosphate ( $\text{PO}_4$ ) over time.

Modalities	Concentrations	Correlation coefficient				Sum of squares of deviations			
		Cl	$\text{NO}_3$	$\text{SO}_4$	$\text{PO}_4$	Cl	$\text{NO}_3$	$\text{SO}_4$	$\text{PO}_4$
Linalool	2	0.998	0.999	0.999	0.982	0.018	0.001	0.582	0.011
	40	0.998	0.998	0.999	0.901	0.018	0.001	0.582	0.021
	80	0.998	0.998	0.999	0.966	0.018	0.001	0.542	0.003
Carvacrol	2	0.998	0.999	0.999	0.973	0.018	0.001	0.359	0.005
	40	0.998	0.999	0.999	0.943	0.018	0.001	0.514	0.002
	80	0.998	0.999	0.999	0.926	0.018	0.001	0.497	0.009
Thymol	2	0.998	0.999	0.999	0.913	0.018	0.001	0.575	0.110
	40	0.998	0.998	0.999	0.998	0.018	0.001	0.397	0.000
	80	0.998	0.999	0.999	0.982	0.019	0.001	0.395	0.004
Control	0	0.998	0.999	0.999	0.982	0.018	0.001	0.216	0.002

Chloride leaching rates did not significantly differ between control COx and the different treatments and concentrations, and were higher than sulphate, nitrate, and phosphate leaching rates (Figure 31). The sulphate leaching rate of COx treated with thymol at  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  was significantly lower than the control's. It significantly varied among antioxidants, and among concentrations in the thymol treatment. It was significantly lower with linalool as compared to thymol. In thymol-amended COx, the sulphate leaching rate was significantly lower at a concentration of  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  of antioxidant than at higher concentrations. The nitrate leaching rates of the samples treated with thymol and carvacrol at 2, 40, and  $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , and linalool at 40 and  $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , were higher than in the controls. The nitrate-leaching rate significantly differed among antioxidants, but not among concentrations. It was lower in the presence of linalool at  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  than in the presence of thymol and carvacrol. The phosphate leaching rate did not significantly differ between the control and antioxidant-amended treatments, but was higher with thymol than with linalool or carvacrol. A significant antioxidant concentration effect was observed on the phosphate leaching rate in the presence of thymol: at  $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , the leaching rate was higher than at  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .



Antioxidant nature	p value	Thymol	Carvacrol	Linalool
Cl	<0.05	A	A	A
SO <sub>4</sub>	<0.05	A	AB	B (40 mg l <sup>-1</sup> )
NO <sub>3</sub>	<0.05	A	A	B (2 mg l <sup>-1</sup> )
PO <sub>4</sub>	<0.05	A	B (80 mg l <sup>-1</sup> )	B (40 and 2mg l <sup>-1</sup> )

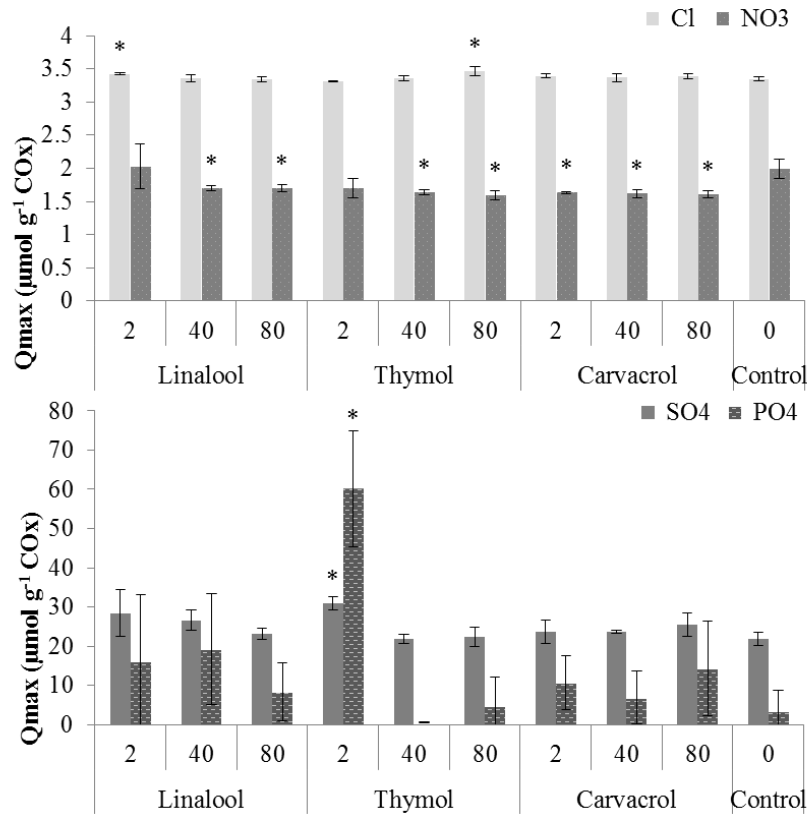
  

Antioxidant Concentration	p value	2	40	80
Cl	<0.05	A	A	A
SO <sub>4</sub>	<0.05	B (thymol)	A	A
NO <sub>3</sub>	<0.05	A	A	A
PO <sub>4</sub>	<0.05	B (thymol)	A	AB

Figure 31: Leaching rate  $K$  ( $\mu\text{mol}.\text{ml}^{-1}$ ) of chloride, nitrate, sulphate, and phosphate in COx amended with the three antioxidants (linalool, thymol and carvacrol) at three concentrations (2, 40, and 80  $\text{mg}.\text{l}^{-1}$ ), and non-amended (control), calculated for S2. Means  $\pm$  standard deviations ( $n=3$ ). Results of the two-way ANOVA and post-hoc tests comparing antioxidant treatments and antioxidant concentrations are shown in the table below. For each element, mean values with the same letter are not significantly different ( $p<0.05$ ), and mean values with "\*" are significantly different from the control ( $p<0.05$ ).

As for chloride leaching, linalool at 2  $\text{mg}.\text{l}^{-1}$  and thymol at 80  $\text{mg}.\text{l}^{-1}$  significantly increased  $Q_{\text{max}}$  as compared to the control (Figure 32). By contrast, as regards nitrate leaching, high concentrations of linalool and thymol (40 and 80  $\text{mg}.\text{l}^{-1}$ , respectively) decreased  $Q_{\text{max}}$  as compared to the control. A similar trend was noted with carvacrol, whatever the antioxidant concentration.  $Q_{\text{max}}$  significantly differed among antioxidants and concentrations, and was higher with linalool and at the lowest antioxidant concentrations (2  $\text{mg}.\text{l}^{-1}$ ).

Thymol at 2  $\text{mg}.\text{l}^{-1}$  significantly increased both sulphate and phosphate  $Q_{\text{max}}$  values as compared to the control. Both sulphate and phosphate  $Q_{\text{max}}$  values significantly differed depending on antioxidant concentrations, whereas phosphate  $Q_{\text{max}}$  also varied with the antioxidant. Sulphate and phosphate  $Q_{\text{max}}$  values were significantly higher with the antioxidants at 2  $\text{mg}.\text{l}^{-1}$  than at 40 and 80  $\text{mg}.\text{l}^{-1}$ . Phosphate  $Q_{\text{max}}$  was significantly lower in the presence of carvacrol than in the presence of thymol.



Antioxidant nature	p value	Thymol	Carvacrol	Linalool
Cl	<0.05	A	A	A
NO <sub>3</sub>	<0.05	B (all concentrations)	B (all concentrations)	A
SO <sub>4</sub>	<0.05	A	A	A
PO <sub>4</sub>	<0.05	A	B (all concentrations)	AB
Antioxidant concentration	p value	2	40	80
Cl	<0.05	A	A	A
NO <sub>3</sub>	<0.05	A	B (all antioxidants)	B (all antioxidants)
SO <sub>4</sub>	<0.05	A	B (thymol, carvacrol)	B (thymol, linalool)
PO <sub>4</sub>	<0.05	A	B (thymol, carvacrol)	B (thymol, linalool)

Figure 32: Maximum leachate concentrations ( $Q_{max}$ ,  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{COx}$ ) for chloride and nitrate (a), sulphate and phosphate (b) in COx amended with the three antioxidants (linalool, thymol, and carvacrol) at three concentrations (2, 40 and 80  $\text{mg.l}^{-1}$ ), and non-amended (control), calculated for S2. Means  $\pm$  standard deviations ( $n=3$ ). Results of the two-way ANOVA and post-hoc tests comparing antioxidant treatments and antioxidant concentrations are shown in the table below. For each element, mean values with the same letter are not significantly different and mean values with “\*” are significantly different as compared to the control ( $p<0.05$ ).

The percentages of sulphur and phosphorus leached from COx after 2 days (S1) and from 9 to 57 days (S2) were calculated. In step 1, leachates represented 7 % of the initial amount for S, and 0.05 % for P, and the percentages of leached S significantly increased in the presence of thymol at 2  $\text{mg.l}^{-1}$  and carvacrol at 40  $\text{mg.l}^{-1}$  (Table 12) as compared to the control. The percentage of leached P also significantly increased in the presence of thymol at 40 and 80  $\text{mg.l}^{-1}$ . In step 2, leachates represented 2.4 % (average value) of the initial amount for S, and 4.9 % for P, and the two percentages significantly increased in the presence of thymol at 2  $\text{mg.l}^{-1}$  as compared to the control. The two-way ANOVA for S1 and S2 showed that P

leaching differed with the antioxidant, and thymol led to the highest leaching percentage. It also showed a concentration effect in S2, with the highest leaching values obtained at 2 mg.l<sup>-1</sup>. A concentration effect was also observed for S leached in S2, with the highest leaching value obtained with 2 mg.l<sup>-1</sup>. In S2, the sulphur leaching percentage was significantly lower in the presence of thymol at 40 and 80 mg.l<sup>-1</sup>, carvacrol at 40 and 80 mg.l<sup>-1</sup>, and linalool at 80 mg.l<sup>-1</sup>, as compared to the same antioxidants at 2 mg.l<sup>-1</sup>.

Table 12 : Percentages of sulphur and phosphorus (%) leached from COx after 57 days of incubation as compared to initial COx. Means ± standard deviations (n=3). Results of the two-way ANOVA and post-hoc tests comparing antioxidant treatments and antioxidant concentrations are shown in the table below. For each element, mean values with the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ), and mean values with “\*” are significantly different as compared to the control ( $p < 0.05$ ). COx initial composition: 260.5 μmol S g<sup>-1</sup> COx, and 8.1 μmol P g<sup>-1</sup> COx.

Antioxidants	Concentrations (mg l <sup>-1</sup> )	element leaching (%)			
		2 days		9 to 57 days	
		S	P	S	P
Linalool	2	7.7 (±1.4)	0.10 (±0.02)	3 (±0.9)	6.1 (±3.1)
	40	7.3 (±0.9)	0.02 (±0.02)	2.8 (±0.4)	5.3 (±1.2)
	80	6.8 (±0.5)	0.02 (±0.02)	2.1 (±0.1)	3 (±0.3)
Thymol	2	8.0 (±0.4) *	0.05 (±0.05)	3.5 (±0.2) *	12.3 (±0.4) *
	40	6.6 (±0.3)	0.10 (±0.02) *	1.8 (±0.2)	4 (±0.2)
	80	6.9 (±0.5)	0.07 (±0.01) *	1.7 (±0.5)	4.5 (±2.6)
Carvacrol	2	6.7 (±0.4)	0.04 (±0.02)	2.3 (±0.6)	4.6 (±1.6)
	40	6.9 (±0.1) *	0.04 (±0.04)	2.2 (±0.0)	3.3 (±1.3)
	80	7.4 (±0.9)	0.01 (±0.01)	2.3 (±0.4)	2.7 (±1.4)
Control	0	6.4 (±0.2)	0.03 (±0.01)	1.9 (±0.4)	3.3 (±1.1)

Antioxidant nature	p value	Thymol		Carvacrol		Linalool	
		2 days	9 to 57 days	2 days	9 to 57 days	2 days	9 to 57 days
S	<0.05	A	A	A	A	A	A
P	<0.05	A	A	B (all concentrations)		B (all concentrations)	

Antioxidant Concentration	p value	2		40		80	
		2 days	9 to 57 days	2 days	9 to 57 days	2 days	9 to 57 days
S	<0.05	A	A	A	B (carvacrol; thymol)		A
P	<0.05	A	A	A	B (all antioxidants)		A

The IR spectra recorded on the COx samples after imbibition or antioxidant addition (Figure 6) were dominated by the typical vibrations of kaolinite (OH stretching vibration bands at 3621 and 3698 cm<sup>-1</sup> and Al-OH and Si-O bending vibrations located at 914 and 471 cm<sup>-1</sup> respectively), quartz (fine bands at 799, 778, and 694 cm<sup>-1</sup>), and calcite. (713 cm<sup>-1</sup> and 874 cm<sup>-1</sup> bending C-O bands). The presence of carbonates is also confirmed by broad C-O stretching vibration at 1430 cm<sup>-1</sup> and combinations of stretching and bending modes at 2516 and 1798 cm<sup>-1</sup>. In Figure 33, the high frequency region of the antioxidant-treated samples differs slightly from those of the two other samples. Beside the broad band of intense hydroxyl-stretching vibrations due to kaolinite and water, the bands at 2853 and 2923 cm<sup>-1</sup> signed the stretching vibration of aryl-CH<sub>3</sub> groups involved in aromatic and methylated molecules.

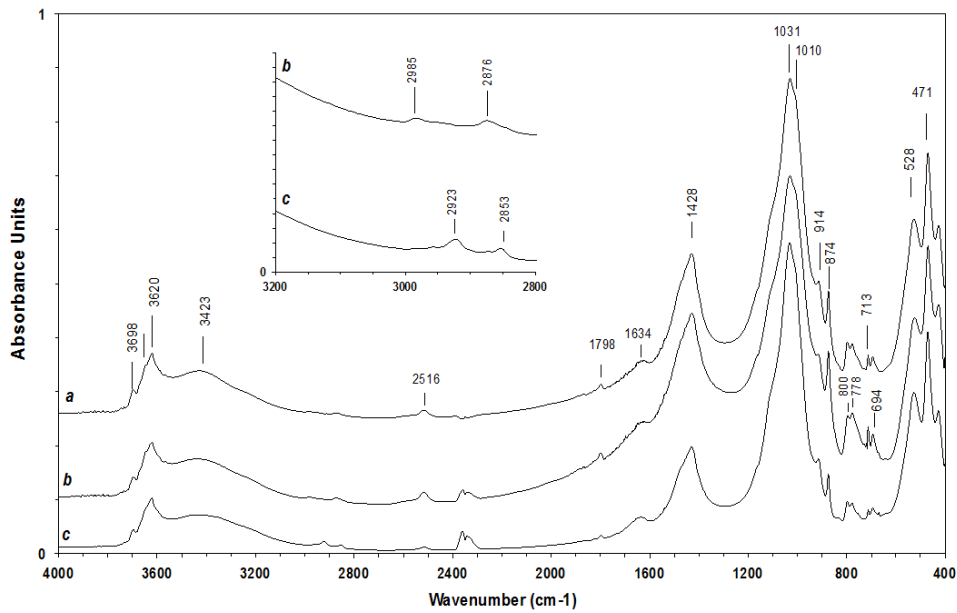


Figure 33: Transmission IR spectra of (a) raw ground sample, (b) H<sub>2</sub>O-treated Cox sample and (c) carvacrol-treated sample (80 mg.l<sup>-1</sup>). Inset shows an enlargement of νC–H region (2800–3200 cm<sup>-1</sup>) of the water (b) and carvacrol (c) treated sample spectrum.

## 1.4 Discussion

### 1.4.1 Stepwise processes

The experimental setup accurately revealed the steps of abiotic leaching of Callovo-Oxfordian material throughout the imbibition-desiccation experiment. Two phases of element leaching were evidenced during the 57 days of imbibition and leaching cycles, whatever the antioxidant input.

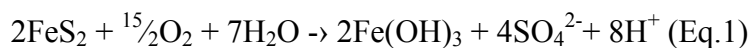
During the first step (S1), corresponding to antioxidant input, the slight pH decrease and the large amount of sulphate in leachates could be explained by the dissolution of some oxidized species that were previously formed during initial alteration of COx. Acidity as a result of pyrite and sulphide alteration has been reported (Gleisner & Herbert Jr., 2002). One of the first physical processes is the rapid hydration of clays and the ensuing change in COx texture. As shown by our results, a short imbibition period (step 1, 2 days) was sufficient to desorb and leach a large quantity of sulphate. During S1, under water and antioxidant leaching, substantial sulphur leaching was noted (6 to 8 %), whereas phosphorus leaching (0.03 %) was limited. This initial leaching of elements may be explained by clay layer spacing when COx was leached using deionized water or antioxidant solutions. Initial nitrate leaching may have been caused by the high reactivity of COx organic matter (Estévez *et al.*, 1990). The presence

of low-molecular-weight organic compounds may also have induced phyllosilicate dissolution (e.g. iron, calcium, and aluminum leaching, not measured).

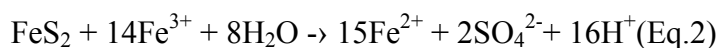
During the second step, pH changes and the dissolution kinetics of anions characterized the overall oxidation and leaching processes of COx as a function of antioxidant input. The increased pH value, from 6.2 to 7.1, was consistent with the study of Elie *et al.* (2004), who reported pH rising from 5.5 to 7.5 when non-oxidized COx was leached by deionized water. The progressive pH increase and the leaching rate were remarkable and signed the alteration processes of constitutive minerals in a ground and wetted clay matter (sulphides, carbonates and alumina-silicates). At S2, corresponding to weekly water leaching, element losses reached 2 % of sulphur, and phosphorus leaching increased up to around 3 %. We observed the lowest nitrate leaching rate and the highest nitrate amounts in the leachate ( $Q_{\max}$ ) in the control columns.

#### 1.4.2 Pyrite oxidation processes in a buffered system

The first step of the physico-chemical alteration of argillite is the oxidation of submicrometric pyrite grains (framboids) dispersed in the clay matrix (Charpentier *et al.*, 2001). In anoxic and deep ground conditions, sulphides act as a redox sink for sulphur and iron. Their solubility is very low, despite their large surface reactivity (Beaucaire *et al.*, 2000). Conversely, under oxic conditions encountered during excavation, decompaction or crushing processes, air-oxidation of these small-sized pyrite particles occurs rapidly via the formation of several intermediate ions and acidic secondary products. According to equation 1, pyrite oxidation by oxygen leads to the release of four moles of protons per mole of oxidized pyrite (Lowson, 1982). Acidification is enhanced by the oxidation of both iron (II) and disulphides (-II)



Many studies of pyrite oxidation kinetics have been done at low pH (pH<2), when soluble ferric ions are assumed to be the most dominant oxidant owing to their increased solubility (Moses *et al.*, 1987). The well-documented reaction describing processes that produce acid mine drainage reads as follows:



By reoxidizing ferrous ions in the leachate, acidophilic iron-oxidizing bacteria favor this electrochemical and autocatalytic reaction and then act as strong dissolution agents of pyrite (Mustin *et al.*, 1992; Pisapia *et al.*, 2007).

However, in our buffered oxidative system close to neutrality, such rapid dissolution processes by electrochemical and autocatalytic mechanisms are ruled out. Owing to the lower solubility of Fe(III), we must assume that the dominant oxidant is dissolved oxygen. Moreover, cell counting showed no detectable bacteria in the ground CO<sub>x</sub> sample. This suggests that mainly abiotic processes occurred in the experiments presented here, although the organic matter associated with pyrite or inside clay layers was a likely efficient organic substrate for microorganisms (Faure *et al.*, 1999). Few works mention that the pyrite oxidation rate can be enhanced in the presence of organic matter (Raichur *et al.*, 2000). In the present study conducted at neutral pH, pyrite oxidation occurred first by chemical oxidation of sulphur(-II) and iron(II) by air and aqueous dissolved oxygen. However, Moses & Herman (1991) suggested an electrochemical mechanism for pyrite oxidation at circumneutral pH that involves adsorbed iron(II). The adsorbed Fe(II) gives up electrons to dissolved oxygen, and the resulting Fe(III) is rapidly reduced by sulphide. Due to successive additions of dissolved oxygen by imbibition, the oxidative cycle of adsorbed iron occurs, and sulfoxy species and protons are generated from the pyrite surface. Thus, the rate of sulphate accumulation in the leachate (*k*) and acidification are implicitly proportional to the rate of pyrite oxidation and to the reactive surface of pyritic matter. According to Nordstrom (1982), electrochemical oxidation of pyrite by ferric iron is a fast and ubiquitous phenomenon. This electrochemical cycle plays an important role in CO<sub>x</sub> alteration and may depend on ferric oxidation by air oxygen (Torma & Bosecker, 1982).

The bulk mineralogy of our CO<sub>x</sub> samples offered a good buffering capacity, especially with the presence of silicates and reactive carbonates, mainly calcite (Table 10). Thus, pH variation was probably due to acidification produced by both pyrite oxidation and precipitation of ferric hydroxide and buffering by carbonates.

The low reactivity of clay minerals is attributable to the presence of organic matter which covered the outer surface of the clay particles. The most reactive sites, i.e. the edges, were then protected.

#### 1.4.3 Effect of antioxidants

Our results show that the effect of antioxidants on CO<sub>x</sub> element leaching depends on antioxidant nature and concentration. Although the three antioxidants increased nitrate leaching and decreased nitrate  $Q_{\max}$  as compared to the control, significant effects on S and P leaching were mainly observed in the presence of thymol. The difference between antioxidants was not related to differential solubility in water since it was lower for thymol (1

g.l<sup>-1</sup>) than for the other two compounds (1.56 g.l<sup>-1</sup> for linalool and 1.25 g.l<sup>-1</sup> for carvacrol). Carvacrol and thymol are two isomeric compounds that mainly differ by the position of the hydroxyl group (Lee *et al.*, 2005). Moreover, the antioxidant capacity of carvacrol is stable over time (Kamimura *et al.* 2014). The differences we noted between antioxidant nature and concentrations might be explained by differential antioxidant adsorption on COx.

In the case of antioxidant-treated samples, the infrared spectra (Figure 33) show the retention (or adsorption) of aromatic compounds in COx. Absorption bands due to the stretching vibration of methyl groups were observed with carvacrol and to a lower extent with thymol (data not shown). Changes in dissolution rates could result from partial covering of sulphide active sites by antioxidants (Meline *et al.*, 1996). The surface coverage could be sufficient to induce a depletion of both iron and sulphur oxidation processes.

The effect of antioxidants on COx element leaching was not proportional to their concentrations. Imbibition with thymol significantly decreased the sulphate leaching rate, increased sulphate  $Q_{\max}$  and leaching percentage as compared to the control. However, these significant effects were only noted at the lowest antioxidant concentration (2 mg.l<sup>-1</sup>). The decreased sulphate leaching rate could be due to inhibition of pyrite oxidation through the formation of an oxidized thymol film complexed to ferric iron from the pyrite surface (Perdicakis *et al.*, 2001). Meline *et al.* (1996) suggested that the inhibition of pyrite oxidation by 2 mg.l<sup>-1</sup> of thymol was due to partial covering of pyrite active sites by thymol and to inhibition of bacterial activity. When thymol was added at 40 and 80 mg.l<sup>-1</sup>, such an effect on sulphate leaching percentages was not observed. Consistently, phenolic compounds have a higher adsorption capacity on hydroxides (e.g. hydroxy-iron) than on clay minerals (Huang *et al.*, 1977).

Besides adsorption, thymol at a low concentration could move into clay layer spacing, stabilize clay structure and decrease the leaching of elements such as charge-compensating cations into clay layer spacing (Stumm, 1992). However, antioxidant sorption on pyrite surfaces is reversible under the effect of washing (Brickett *et al.*, 1995). During the leaching step (S2), antioxidant adsorption may therefore have decreased due to water leaching and to thymol volatilization from pyrite and surfaces, as previously noted by Meline *et al.* (1996).

Aromatic compounds, i.e. antioxidants, may limit physicochemical and biological mineral weathering (Mustin *et al.*, 1992; Kraus *et al.*, 2003). The antioxidant can inhibit microbial activity and therefore microbial weathering (Meline *et al.*, 1996). In our experiment, where only physicochemical weathering was considered, antioxidant addition increased alteration,



with S and P leaching. However, this effect could be further investigated under biotic conditions to include the indirect effect on microbe-mediated alteration.

### 1.5 Conclusion

The biologically-produced antioxidant compounds we tested did not reduce CO<sub>x</sub> weathering throughout the experiment. Increased sulphate leaching was noted in the presence of the three selected antioxidant molecules, with a maximum effect with thymol at a low concentration (2 mg.l<sup>-1</sup>). However, a decreased sulphate leaching rate was observed in the presence of thymol at 2 mg.l<sup>-1</sup>, together with decreased nitrate leaching in antioxidant-amended CO<sub>x</sub>. Antioxidants may interact with pyrite and organic matter electrochemical properties as well as potentially with biological activity.



## 2 Effets des antioxydants et des exsudats racinaires de plante sur la dissolution minérale du COx

### Effects of plant antioxidants and root exudates on mineral dissolution of Callovo-Oxfordian clay substrate

Ubersfeld Dimitri<sup>1,2</sup>, Leyval Corinne<sup>1,2</sup>, Redon Paul-Olivier<sup>3</sup>, Mustin Christian<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Université de Lorraine, LIEC, Faculty of Sciences and Technology, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

<sup>2</sup> CNRS, LIEC, Faculty of Sciences and Technology, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

<sup>3</sup> Andra, Direction de la Recherche et Développement, Route départementale 960 – BP 9, 55290 Bure, France

#### 2.1 Introduction

In mining processes, many management procedures are designed to reduce water run-off pollution from excavated materials. Because the protection of stockpiles is a year-round requirement, sustainable stabilization measures involving coverage or protection with soil or plants are frequently investigated. In particular, the excavation of claystone materials, such as Callovo-Oxfordian argilite (COx) at Andra Underground Research Laboratory (Bure, France), lead to the formation of clayed stockpiles that could be altered by rainfall and colonization by microorganisms and plants. Clay materials are considered as potential barriers in soil preventing pollutant leaching. However, plant growth is limited in nutrient-poor substrates such as bedrock or clay materials (Marschner, 2012).

Plant root exudates, which consist of a complex mixture of organic compounds (carboxylic acids, quinones, ...), sustain microbial growth and activity in the rhizosphere and also promote mineral alteration in common or nutrient-poor soil (Berthelin, 1988; Leyval & Joner, 2001; Hinsinger, 1998; Hinsinger et al., 2003). Carbon compounds, including organic acids produced by plant roots lead to pH or redox changes favoring mineral dissolution (Hinsinger, 1998). Thus, plant and microbial concomitant activities increase mineral weathering (Gadd,

2007) and induce a positive feedback on nutrient bioavailability and bedrock or substrate colonization.

COx material is characterized by a rich content in clay mineral, carbonates and sulphides: smectite, kaolinite, illite, mixed-layer illite/smectite and pyrites, iron oxides, siderite and dolomite (Gaucher et al., 2004; Andra, 2005; Lerouge et al., 2011). Consequently, weathering mechanisms may cause sulphide or clay mineral dissolution by oxidation or reduction and hydrolysis and then enhanced sulphur, iron, potassium and strontium leaching (Mustin et al., 1993; Pisapia et al., 2008; Esnault et al., 2013). In counterpart, carbonate weathering may lead to calcium and magnesium leaching.

The low availability of essential elements in clay environments, such as Callovo-Oxfordian argillite (COx), poses a challenge to nutrient acquisition by plant roots, and threatens the survival of many beneficial microbes and plants considered for phytostabilisation. In nutrient-poor and arid environments, some plant families such as *Lamiaceae* promote the growth and survival of neighbouring plants (Duponnois et al., 2011). They produce also a large variety of antioxidants via shoot or root metabolite synthesis (Daferera et al., 2002; Anthony et al., 2012) which affect soil microbial activity. In particular, phenolic terpenoids and electroactive substances like thymol reduce sulphur mineral oxidation rates and select microbial activities (Berthelin et al., 1974; Mustin et al., 1992; Meline et al., 1996). In a previous study, we showed that phenolic compounds like thymol decreased sulphur leaching rate from a freshly excavated COx sample (Ubersfeld et al., submitted, Chapter IV-1).

We hypothesized that thymol might reduce biological and physico-chemical COx weathering. A column experiment was conducted with COx artificially leached under controlled conditions for 3 months. Plant rhizosphere effect was simulated by using artificial root exudates (ARE) (Griffiths et al., 1998; Joner et al., 2002) providing carbon substrates for microbial activity and dynamics. To confirm the hypothesis that COx weathering was mediated via pyrite oxidation, part of the COx sample was spiked with ground pyrite. There were three modalities in a factorial design (1) inoculation with bacteria from topsoil and addition of artificial root exudates, (2) spiking with pyrite, (3) leaching with thymol at three concentrations 0.2; 2 or 20 mg.l<sup>-1</sup>. Argillite alteration was assessed by measuring anion (chloride, sulphate, phosphate, nitrate) and cation (calcium, potassium, magnesium, sodium, aluminum, arsenic, strontium, iron) leaching and pH at each sampling time. Microbiological analyses were performed at the end of the incubation to estimate bacterial abundance.

## 2.2 *Materials and Methods*

### 2.2.1 *Clay sample*

The clay sample of Callovo-Oxfordian was excavated in June 2013 from the Andra Underground Research Laboratory (URL) (Bure, France). The COx sample is mainly made of carbonates and clay minerals. The COx sample was ground and sieved to keep the 2- to 3-mm fraction. Mean mineralogical composition consists of 40 % interstratified clay (illite/smectite), 20 % quartz, 30 % carbonate (mainly calcite), 5 % feldspar, less than 2 % pyrite, and 2 % of low mature organic materials. Details of elemental composition and granulometric classes of this so-called Callovian-Oxfordian (COx) geological formation sample are given in Ubersfeld et al.,(submitted), Gaucher et al., (2004) ; Lerouge et al., (2011).

### 2.2.2 *Pyrite enrichment*

Pyrite enrichment was performed with natural pyritic sample, originating from a sedimentary deposit in Spain (Logroño). The pyrite had Fe and S contents of 46.23 and 52.97% (wt/wt), respectively and minor impurities. Chemical analysis revealed traces of arsenic (0.3%), titanium and nickel. These impurities should be considered from a geological point as substitutions or intercalations in the pyrite lattice during crystal growth in the sediment. 200 g of pyrite was ground and sieved to keep the fraction below 20 µm. In order to remove oxidized surface compounds, such as sulphates and iron oxides, ground samples were washed with sulphuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 %, 1 hour.) A cleaned and sterile fraction of the powdered pyrite was obtained after sterilization (110°C, 30 min) in an aqueous acidic medium (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 %). Sterilized sample were then rinsed with sterile deionized water and dried at 70°C over day. A portion of ground and sterilized pyrite was mixed with the COx sample to reach a final content of 3.33% w/w of pyrite (32 g of pyrite for 960 g of COx).

### 2.2.3 *Antioxidant and artificial root exudate solutions*

COx imbibition solutions were prepared with deionized water or Artificial Root Exudates (ARE) according to (Griffiths et al., 1998; Joner et al., 2002). The synthetic exudate solution consisted of 20 mM of fructose, 20 mM of glucose, 20 mM of sucrose, 10 mM of succinic acid, 10 mM of malic acid, 5mM of arginine, 5mM of serine and 5 mM of cysteine. Both water and ARE solutions were spiked with thymol at 0.2, 2 and 20 mg.l<sup>-1</sup> (ref: 16254, Sigma).

These solutions and their corresponding control without thymol were filtered to 0.22  $\mu\text{m}$  in sterile conditions for immediate use.

#### 2.2.4 *Microbial inoculum*

Microbial inoculum was prepared according to (Joner & Leyval, 2003), from a URL topsoil sample. A 200 g soil sample was moistened to 30 % of the water retention capacity and incubated at 28°C for 48 hours to enhance microbial development. The soil sample was then mixed with one liter of sterile distilled water in a blender mixer for 60 seconds. The supernatant was centrifuged at 1000 g for 2 min to remove soil particles. An additional centrifugation at 10000 g for 10 min was performed on the supernatant to pellet microorganisms. Microbial pellet was then diluted in ARE solution in order to reach an inoculum at  $10^9$  cells per ml.

#### 2.2.5 *Experimental set-up*

Experimental devices consisted of column-like units based on a sterile vacuum filtration system (0.45  $\mu\text{m}$  and 150 mL) with a sterile vial underneath the column to collect leachates (Nalgene®, ref: 513-1552, VWR). The columns were filled with 30 g of COx with or without 1 g pyrite enrichment. The columns with (P) or without pyrite enrichment were filled with 15 ml of ARE with microbial inoculum in order to reach  $10^7$  bacteria  $\text{g}^{-1}$  COx (EBP and EB) or 15 mL of sterile deionized water (P and C) for non-inoculated controls. All columns were kept for 5 days at 28°C to promote microbial development in COx inoculated with ARE and microorganisms. After 5 days, the columns were watered weekly with 15 ml of thymol at 0, 0.2, 2 and 20  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  either in ARE (EB, EBP treatments) or in deionized water (P and C). There were four replicates for each treatment, leading to 64 experimental units. After 72 hours of contact, filtered leachates were collected into the vials with a vacuum pump for thirty minutes. The experimental devices were kept in a controlled chamber (28°C, 40 % hygrometry) for 88 days.

#### 2.2.6 *Chemical analysis*

Prior to chemical analysis, the pH of leachates was measured under an aseptic sterile atmosphere (Meterlab PHM250), before filtration at 0.22  $\mu\text{m}$  and storage in a dark room at 4°C. Anion concentrations (sulphate, chloride, phosphate, and nitrate) in leachates were measured on a Dionex ICS-3000 ion chromatography system (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA). Isocratic separations of  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  were carried out using a

polymeric surface-sulfonated analytical column (AS20, 4 mm x 50 mm) and a conductimetric detector. A reagent-free eluent generator (EGC II - KOH cartridge) was used to generate potassium hydroxide eluent gradient at a flow-rate of 1 ml/min. The IC system was fitted with a 25 µl loop and an autosampler for sample processing. System control and post-run analysis were performed with Chromeleon® software (version 6.80, Dionex). The quantification limit for all analyses was estimated to 50 µg l<sup>-1</sup> with an uncertainty of 60% according to the NF T 90-210 norm. Leachate cation concentrations (Ca, K, Mg, Na, Al, As, Sr, Fe) were measured using Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) using a Varian 720 ES model. All samples were analysed in quadruplicate and run together with certified reference materials (stream sediments NCSDS 36006 and NCSDS 36004).

The identification and quantification of organic acids were performed using an ion chromatograph (ICS 3000, Dionex Corp.) equipped with a conductivity detector and an analytical column with alkanol quaternary ammonium groups (AS11-HC IonPac, Dionex corp.) thermoregulated at 35°C. The analytes were eluted with a potassium hydroxide eluent gradient ranging from 0.9 mM to 60 mM at a flow rate of 1.3 ml / min. The duration of elution was 60 min. The quantification limit for organic acid analyses was 50 µg l<sup>-1</sup>. Organic acids were only measured on EB and EBP CO<sub>x</sub> leachates.

#### 2.2.7 Microbiological analyses

The enumeration of indigenous bacteria in the freshly ground clay sample was performed by Most Probable Number (MPN) method. Ten-fold dilutions of a CO<sub>x</sub> suspension (10 g /100 ml) ranging from 1 to 10<sup>-8</sup> were incubated over two days at 28°C in 96-well microplates containing Luria Bertani culture medium. Positive wells were scored by optical density measurements at 620 nm (SAFAS Xenius FLX, Monaco). Cell numbers were estimated using MPN toolbox software, Version 4.04 (USA EPA).

At the end of incubation, microbial abundance (fungi and bacteria) in various conditions (without or with thymol at 20 mg.l<sup>-1</sup>) was estimated by real-time PCR. 16S and 18S rDNA genes were amplified using eubacteria universal primers 968F and 1401R (Felske et al., 1998) and fungal universal primers Fung5F and FF390R (Lueders et al., 2004). The quantification of rDNA gene copies was performed using a Real-Time PCR detection system (CFX96 - Bio-Rad).

Prior to amplification, DNA extraction from CO<sub>x</sub> was performed using extraction kit FastDNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) according to manufacturer's use protocol : 0.5 g of freshly ground sample were mixed with 80 µl of lysis solution. Amplification

reactions (20  $\mu\text{l}$  final volume) were performed using 10  $\mu\text{l}$  of iQ SYBR green SuperMix (Bio-Rad), 0.8  $\mu\text{l}$  of each primer (10  $\mu\text{M}$ ), 0.4  $\mu\text{l}$  of 3% BSA (bovine serum albumin) solution, 0.2  $\mu\text{l}$  of DMSO (dimethyl sulfoxide), 0.08  $\mu\text{l}$  of T4 bacteriophage gene 32 product (MP Biomedicals, France) and 1  $\mu\text{l}$  of three-fold diluted DNA, corresponding to 3.1 to 7.8 ng. The PCR conditions were as follows: 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 seconds, 54°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and a final extension step at 72°C for 7 min. The 16S and 18S rDNA gene copy numbers were estimated using SYBR Green (iQ SYBR Green SuperMix, Biorad): from 51°C to 95°C, increased 0.5°C every 10 seconds, fluorescence acquisition (Cébron et al. 2008; Thion et al. 2012). Quantitative calibration was performed by using standard plasmid dilution series ( $10^8$  to  $10^1$  copies  $\mu\text{l}^{-1}$ ) (Cébron et al., 2008; Thion et al., 2012). Data were expressed in 16S and 18S rDNA gene copy numbers  $\text{g}^{-1}$ .

### 2.2.8 Data analysis

For studying the volume-dependent leaching of species from COx samples, first-order kinetics reaction models were used as described in Ubersfeld et al.,(submitted, Chapter IV-1). This model proceeds at a rate that depends linearly on the amount of a given element. The differential equation describing first-order kinetics is:

$$r = d[M] / dV = -k [M]^n \quad n=1$$

where, M is the amount of anions leached ( $\mu\text{M}$  per gram of COx claystone), V is the reaction volume, i.e the percolated volume (ml), r the reaction rate ( $\mu\text{mol ml}^{-1}$ ), and K the first-order rate constant ( $\text{ml}^{-1}$ ).

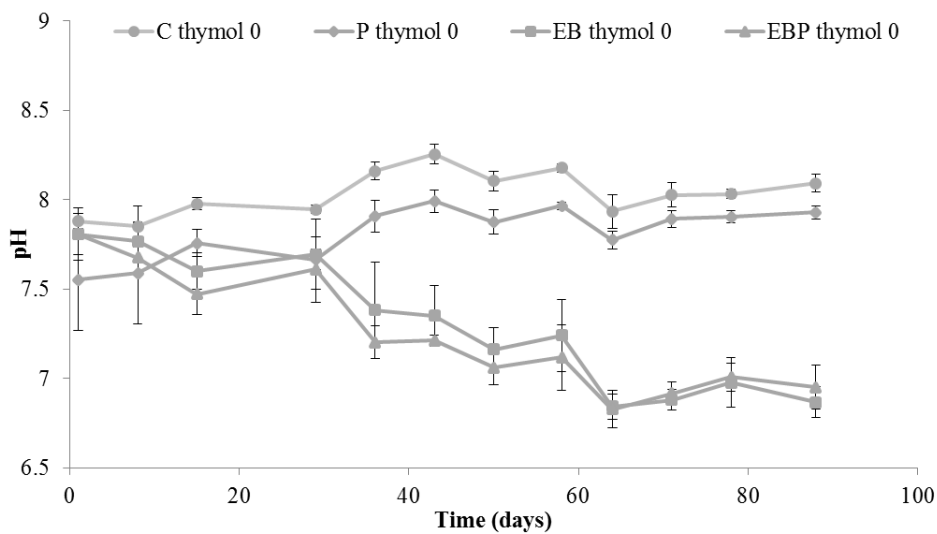
Normality was tested using Shapiro-Wilk's test, and then comparisons among treatments for each parameter were made using one-way or two-way ANOVA followed by Fisher's LSD test to compare differences among multiple groups at the significance level  $p = 0.05$ . For percentage data, values were arcsine-transformed before statistical tests. XLStat Software (version 2012.6.01) was used for data processing.

### 2.3 Results

At day 1 and day 88, the leachate pH from COx without amendment (Control C) was significantly higher compared to those with EB, EBP and P amendments whatever the antioxidant concentration. At the day 8, leachate pH in presence of P amendment were the lowest in comparison with others amendments. However, at the day 88, leachate pH from COx with EB and EBP amendments were the lowest value compared to P and C amendment. The leachate pH values significantly decreased from 7.80 to 6.98 (average values) for EB and



EBP treatments and significantly increased from 6.45 to 8.01 (average values) for C and P treatments, except for P treatment without thymol where the difference was not significant (Figure 34). At day 8 and all along the experiment, without microbial inoculation and ARE addition, leachate pH values from pyrite-enriched COx (P) were significantly lower than leachate pH from COx without pyrite (C) whatever the thymol concentration. From day 36 to the end of the experiment, the leachate pH values for EB and EBP amended COx were significantly lower than for P and C amended COx whatever the antioxidant input. However, no significant difference in pH values was observed between EBP and EB amended COx and between thymol concentrations.



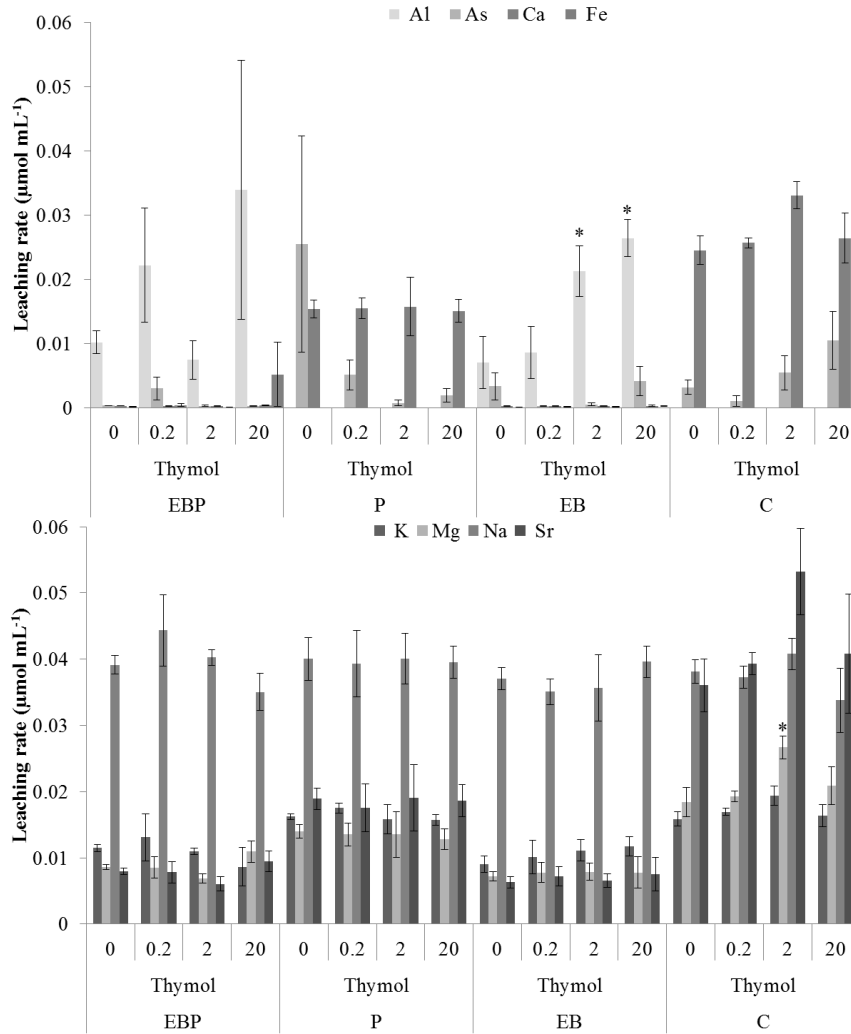
Antioxidant concentration	0	0.2	2	20
8 days	A	A	A	A
88 days	A	A	A	A
Treatment	EBP	P	EB	C
8 days	BC	C	AB	A
88 days	C	B	C	A

Figure 34 : Leachate pH changes over time with COx, amended with,; artificial root exudates and bacteria (EB); artificial root exudates and bacteria, and pyrite (EBP); with pyrite (P) and non-amended control (C) and with thymol at four different concentrations (0; 0.2; 2 and 20 mg.l<sup>-1</sup>). Mean ± standard deviation (n=4). Results of the two-way ANOVA and post-hoc tests comparing antioxidant concentration and C; P; EBP and EB are shown in the table below at 8 and 88 days. For each condition, mean values with the same letter are not significantly different (p<0.05) at 8 and 88 days.

For each thymol concentration, anion and cation concentrations in leachates were estimated by using kinetics reaction model. A first order kinetics reaction model was estimated for all species by linear regression of discrete variation of concentration and validated by the correlation coefficient close to 0.99 and sum of squares of deviations close to 0 between model values and corresponding distributed variables values (i.e. leached cumulated quantity

over time of anions and cations). Leaching rate of each element ( $k$ ,  $\mu\text{mol ml}^{-1}$ ) was determined by the slope of the model curve.

Potassium and strontium leaching rates were significantly lower for EBP and EB amended COx than for P amended and control COx, but they did not significantly differ between the different thymol concentration exposures (Figure 35). Aluminium leaching rates were significantly higher for EB and EBP amended COx than for P amended and control COx, and were significantly higher with 2 and 20  $\text{mg.l}^{-1}$  of thymol than without thymol for EB amended COx. Calcium and magnesium leaching rates were significantly lower with EB and EBP amended COx than P amended and control COx. However, they did not significantly differ between antioxidant concentrations, except for magnesium leaching rate with control COx where it was higher with 2  $\text{mg.l}^{-1}$  thymol addition.

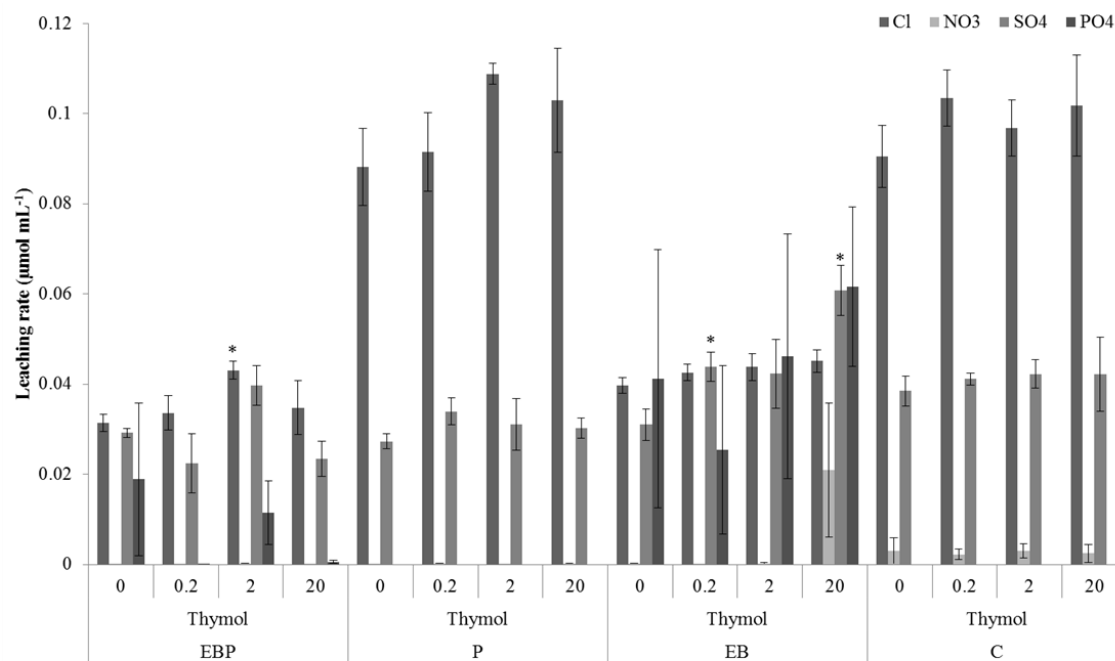


Antioxidant concentration	0	0.2	2	20	Treatment	EBP	P	EB	C
Al	B	AB	AB	A	Al	A		A	
As	A	A	A	A	As	B	A	AB	AB
Ca	A	A	A	A	Ca	C	B	C	A
Fe	A	A	A	A	Fe	A		A	
K	A	A	A	A	K	B	A	B	A
Mg	A	A	A	A	Mg	C	B	C	A
Na	A	A	A	A	Na	A	A	A	A
Sr	A	A	A	A	Sr	C	B	C	A

Figure 35 : Leaching rate ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ) for arsenic (As), calcium (Ca), potassium (K), magnesium (Mg), sodium (Na), strontium (Sr) for the COx amended with: artificial root exudates and bacteria (EB); artificial root exudates and bacteria, and pyrite (EBP); pyrite (P) and non-amended control (C). and with thymol at four concentrations (0; 0.2; 2 and 20  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Mean  $\pm$  standard deviation ( $n=4$ ). Results of the two-way ANOVA and post-hoc tests comparing C; P; EBP and EB for each treatment and antioxidant concentration are shown in the table below. For each element, mean values with the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ). For each element, mean values with “\*” are significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

Chlorine leaching rate was significantly lower for EB and EBP amended than P amended and control COx (Figure 36). It was significantly increased by the addition of thymol at 2  $\text{mg.L}^{-1}$  for EBP amended COx. Sulphate leaching rates were lower for EBP and P amended COx than

EB amended and control COx. Sulphate leaching rate for EB amended COx was higher with thymol at 2 and 20 mg.l<sup>-1</sup> than without thymol addition. Nitrate leaching rates did not significantly differ between control COx and the different treatments and antioxidant concentrations. Phosphate leaching rate was significantly higher with EB amended COx than with the other amendments and the control COx.



Antioxidant concentration	0	0.2	2	20	Treatment	EBP	P	EB	C
Cl	B	AB	A	AB	Cl	B	A	B	A
NO <sub>3</sub>	A	A	A	A	NO <sub>3</sub>	A	A	A	A
SO <sub>4</sub>	B	AB	A	A	SO <sub>4</sub>	B	B	A	A
PO <sub>4</sub>	A	A	A	A	PO <sub>4</sub>	B	B	A	B

Figure 36 : Leaching rate ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ) for chlorine, nitrate, sulphate for the COx amended with: artificial root exudates and bacteria (EB); artificial root exudates and bacteria, and pyrite (EBP); pyrite (P) and non-amended control (C), and with thymol at four concentrations (0; 0.2; 2 and 20 mg.l<sup>-1</sup>). Mean  $\pm$  standard deviation (n=4). Results of the two-way ANOVA and post-hoc tests are shown in the table below. For each element, mean values with the same letter are not significantly different and mean values with “\*” are significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

Using MPN method, no bacteria were detected in the freshly excavated COx sample. That is why it was inoculated with a microbial suspension from a neighbouring soil for the column experiment. At the end of the experiment, bacterial abundance for COx amended with thymol at 20 mg.l<sup>-1</sup> was lower than COx without thymol amendment (Figure 37). It was significantly 10<sup>3</sup> fold higher in inoculated and ARE amended COx (EB and EBP) than in P amended or control treatment (C). Fungi were only detected in the former treatments by quantification of 18S rDNA gene. The addition of 20 mg.l<sup>-1</sup> of thymol lead to a significant decrease of bacterial

gene copy number for EB amended COx, but increased the fungal gene copy number in EBP amended COx.

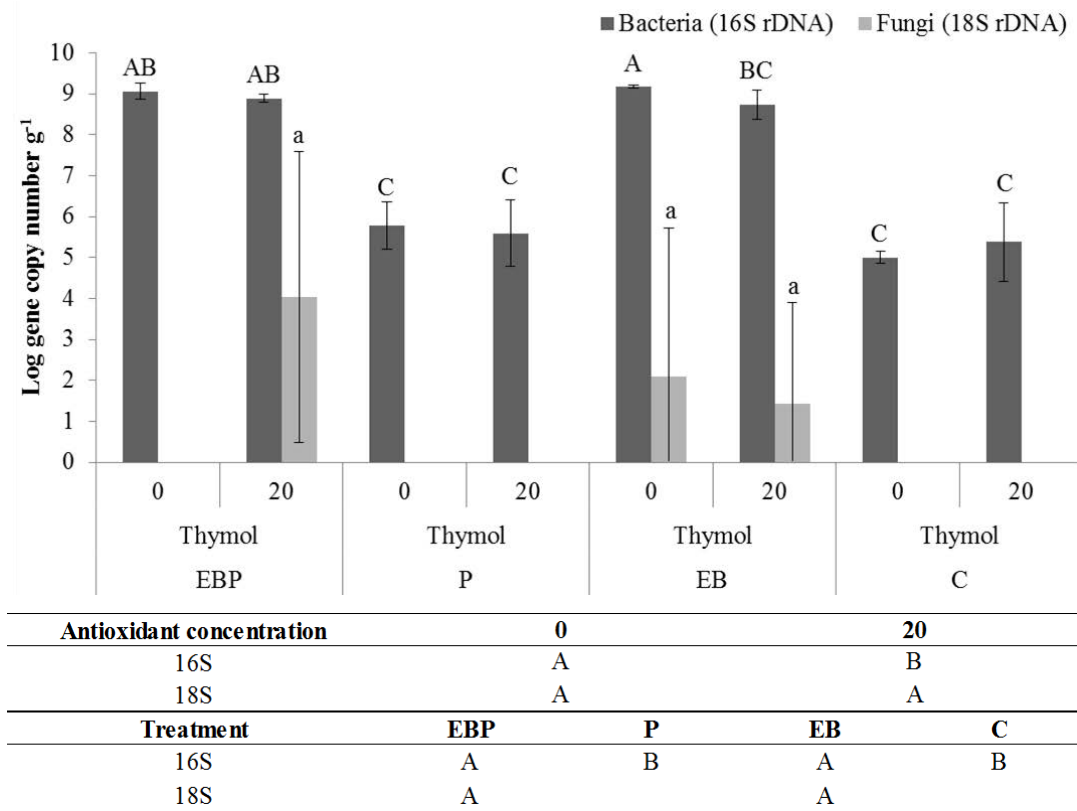


Figure 37 : Bacterial and fungal abundance (16S and 18S rDNA gene copy number  $g^{-1}$ ) after 88 days in the COx leached with thymol at 0  $mg.l^{-1}$  or 20  $mg.l^{-1}$  amended with: artificial root exudates and bacteria (EB); artificial root exudates and bacteria, and pyrite (EBP); pyrite (P) and non-amended control (C). Mean  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ). Results of the two-way ANOVA and post-hoc tests are shown in the table below. Mean values with the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

The percentage of element leached from the COx during the 88 days of experiment was calculated from its initial element composition (Ubersfeld et al., submitted, Chapter IV-1). Phosphorus leaching percentage was significantly higher for EB than EBP amended COx than P amended and control COx (Table 13). Significant increase was observed with thymol addition at 2  $mg.l^{-1}$ . Sulphate leaching percentage from EBP amended COx treated with thymol at 0.2 and 20  $mg.l^{-1}$  and for EB amended COx with 20  $mg.l^{-1}$  thymol were significantly lower than controls without thymol. Sulphate leaching percentage from pyrite, ARE and bacterial amended COx (EBP) was significantly lower than for the other treatments. However, EBP amended COx leached significantly less sulphate than P amended COx.

Antioxidants concentration	Treatment	element leaching (%)		
		S	P	
<b>Thymol</b>				
0	EBP	2.04 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.7 ± 0.8 <sup>a</sup>	
	P	3.6 ± 0.2 <sup>b</sup>		
	EB	6.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>ab</sup>	
	C	6.6 ± 0.8 <sup>a</sup>		
0.2	EBP	1.4 ± 0.5 <sup>c*</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	
	P	3.6 ± 0.3 <sup>b</sup>		
	EB	5.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	
	C	6.4 ± 0.3 <sup>a</sup>		
2	EBP	1.9 ± 0.3 <sup>c</sup>	0.9 ± 1.0 <sup>ab</sup>	
	P	3.7 ± 0.5 <sup>b</sup>		
	EB	6.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	1.5 ± 1.5 <sup>a</sup>	
	C	6.4 ± 0.7 <sup>a</sup>		
20	EBP	1.6 ± 0.3 <sup>c*</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	
	P	3.6 ± 0.2 <sup>b</sup>		
	EB	4.8 ± 0.7 <sup>b*</sup>	0.9 ± 0.7 <sup>a</sup>	
	C	6.8 ± 2.1 <sup>a</sup>		
<b>Antioxidant concentration</b>	<b>0</b>	<b>0.2</b>	<b>2</b>	<b>20</b>
S	A	A	A	A
P	B	B	A	AB
<b>Treatment</b>	<b>EBP</b>	<b>P</b>	<b>EB</b>	<b>C</b>
S	D	C	B	A
P	B		A	

Table 13 : Percentage of leached sulfur and phosphorus (%) from COx after 88 days of incubation compared to the initial COx. COx amended with: artificial root exudates and bacteria (EB); artificial root exudates and bacteria, and pyrite (EBP); pyrite (P) and non-amended control (C), and with thymol at four concentrations (0; 0.2; 2 and 20 mg.l<sup>-1</sup>). Mean ± standard deviation (n=4). Results of two-way ANOVA and post-hoc tests comparing the antioxidant concentrations and treatment nature are shown in the table below. For each element, mean values with the same letter are not significantly different (p<0.05). For each element, mean values with “\*” are significantly different compared to control (p< ) COx initial composition is or μmol.g<sup>-1</sup> COx of S without or with pyrite and 8.1 μmol.g<sup>-1</sup> COx of P, S and P leaching (%) were calculated.

Aluminium, calcium, iron, potassium, magnesium and sodium leaching percentages were significantly higher for EB and EBP amended COx than P amended and control COx (Table 14). Iron leaching percentage was significantly lower for EBP than EB amended COx. Calcium, potassium, magnesium and sodium leaching percentages were higher for P amended COx without thymol than control COx without thymol. Although there was no global effect of antioxidant concentration, similar results were observed for P amended COx treated with thymol at 0.2 mg.l<sup>-1</sup>. Potassium and magnesium leaching percentages were lower for P amended COx treated with thymol at 2 and 20 mg.l<sup>-1</sup> than control COx treated with the same antioxidant concentrations.

Antioxidants concentration Treatment		element leaching					
		% Al	Ca	Fe	% K	Mg	Na
<b>Thymol</b>							
0	<b>EBP</b>	0.039 ±0.001 <sup>a</sup>	3.6 ±0.2 <sup>a</sup>	0.08 ±0.06 <sup>b</sup>	2.4 ±0.1 <sup>a</sup>	2.3 ±0.1 <sup>a</sup>	65.4 ±1.9 <sup>a</sup>
	<b>P</b>	0.002 ±0.001 <sup>b</sup>	0.5 ±0.1 <sup>b</sup>		1.40 ±0.05 <sup>b</sup>	0.9 ±0.1 <sup>b</sup>	54.5 ±5.0 <sup>b</sup>
	<b>EB</b>	0.034 ±0.008 <sup>a</sup>	3.4 ±0.3 <sup>a</sup>	0.20 ±0.02 <sup>a</sup>	2.4 ±0.2 <sup>a</sup>	2.3 ±0.1 <sup>a</sup>	66.6 ±2.6 <sup>a</sup>
	<b>C</b>	0.003 ±0.002 <sup>b</sup>	0.20 ±0.02 <sup>c</sup>		1.0 ±0.1 <sup>c</sup>	0.40 ±0.04 <sup>c</sup>	47.7 ±3.0 <sup>c</sup>
0.2	<b>EBP</b>	0.045 ±0.018 <sup>a</sup>	3.5 ±0.3 <sup>a</sup>	0.08 ±0.02 <sup>b</sup>	2.3 ±0.3 <sup>a</sup>	2.2 ±0.2 <sup>a</sup>	61.3 ±7.5 <sup>b</sup>
	<b>P</b>	0.003 ±0.001 <sup>b</sup>	0.6 ±0.1 <sup>b</sup>		1.4 ±0.1 <sup>b</sup>	1 ±0.1 <sup>b</sup>	55.9 ±8.3 <sup>bc</sup>
	<b>EB</b>	0.031 ±0.001 <sup>a</sup>	3.4 ±0.2 <sup>a</sup>	0.20 ±0.04 <sup>a</sup>	2.4 ±0.3 <sup>a</sup>	2.4 ±0.1 <sup>a</sup>	70.4 ±3.2 <sup>a</sup>
	<b>C</b>	0.002 ±0.002 <sup>b</sup>	0.20 ±0.01 <sup>c</sup>		1.00 ±0.03 <sup>c</sup>	0.38 ±0.01 <sup>c</sup>	49.1 ±1.9 <sup>c</sup>
2	<b>EBP</b>	0.046 ±0.002 <sup>a</sup>	3.3 ±0.5 <sup>a</sup>	0.10 ±0.03 <sup>b</sup>	2.3 ±0.2 <sup>a</sup>	2.2 ±0.2 <sup>a</sup>	64.4 ±4.3 <sup>ab</sup>
	<b>P</b>	0.002 ±0.001 <sup>b</sup>	0.5 ±0.1 <sup>b</sup>		1.4 ±0.1 <sup>b</sup>	0.9 ±0.2 <sup>b</sup>	54.3 ±4.2 <sup>bc</sup>
	<b>EB</b>	0.029 ±0.016 <sup>a</sup>	3.4 ±0.5 <sup>a</sup>	0.20 ±0.03 <sup>a</sup>	2.4 ±0.4 <sup>a</sup>	2.4 ±0.3 <sup>a</sup>	70.4 ±9.5 <sup>a</sup>
	<b>C</b>	0.002 ±0.001 <sup>b</sup>	0.20 ±0.02 <sup>b</sup>		0.9 ±0.1 <sup>c</sup>	0.30 ±0.05 <sup>c</sup>	47.7 ±3.8 <sup>c</sup>
20	<b>EBP</b>	0.025 ±0.013 <sup>a</sup>	3.2 ±0.5 <sup>a</sup>	0.06 ±0.02 <sup>b</sup>	2.5 ±0.3 <sup>a</sup>	2.2 ±0.2 <sup>a</sup>	69.4 ±5.2 <sup>a</sup>
	<b>P</b>	0.003 ±0.001 <sup>b</sup>	0.50 ±0.04 <sup>b</sup>		1.40 ±0.05 <sup>b</sup>	0.9 ±0.1 <sup>b</sup>	55.1 ±4.0 <sup>bc</sup>
	<b>EB</b>	0.034 ±0.009 <sup>a</sup>	3.4 ±0.5 <sup>a</sup>	0.20 ±0.05 <sup>a</sup>	2.3 ±0.2 <sup>a</sup>	2.3 ±0.2 <sup>a</sup>	65.6 ±6.0 <sup>ab</sup>
	<b>C</b>	0.002 ±0.001 <sup>b</sup>	0.20 ±0.04 <sup>b</sup>		1.0 ±0.2 <sup>c</sup>	0.4 ±0.1 <sup>c</sup>	53.7 ±10.8 <sup>c</sup>

Antioxidant concentration	0	0.2	2	20
Al	A	A	A	A
Ca	A	A	A	A
Fe	A	A	A	A
K	A	A	A	A
Mg	A	A	A	A
Na	A	A	A	A

Treatment	EBP	P	EB	C
Al	A	B	A	B
Ca	A	B	A	C
Fe	B		A	
K	A	B	A	C
Mg	A	B	A	C
Na	A	B	A	C

Table 14 : Percentage of leached aluminium, calcium, iron, potassium, magnesium, sodium (%) of COx after 88 days of incubation compared to the initial COx. Mean ± SD (n=4). Results of the two-way ANOVA and post-hoc tests comparing the antioxidant concentrations and treatment nature are shown in the table below. For each element, mean values with the same letter are not significantly different (p<0.05). For each element, mean values with “\*” are significantly different compared to control (p<0.05). COx initial composition is 9.740 mmol.g<sup>-1</sup> COx of Al, 2.702 mmol.g<sup>-1</sup> COx of Ca, 1.931 or 6.430 mmol.g<sup>-1</sup> COx of Fe without or with pyrite, 411 µmol.g<sup>-1</sup> COx of K, 1.012 mmol.g<sup>-1</sup> COx of Mg, 49 µmol.g<sup>-1</sup> COx of Na; Al, Ca, Fe, K, Mg, Na leaching (%) were calculated.

A large variety of organic acids were identified in the leachates of ARE amended COx: gluconate, lactate, acetate, propionate, formate, butyrate, pyruvate, succinate, maleate, oxalate, fumarate. Only the ones with the highest concentrations are presented. Organic acid concentrations in leachates slightly differed between the antioxidant concentrations (Figure 38) but were not significantly affected by the presence of pyrite (statistical analysis not shown). The organic acids quantified differed between the beginning (day 1) and the end (day 88) of the experiment. At day 1, gluconate and succinate were dominant and their

concentrations in leachates tended to be lower for EBP amended COx with 20 mg.l<sup>-1</sup> of thymol than for the other concentrations. Acetate, pyruvate, formate were also quantified, but there was no significant difference between thymol concentrations, except for acetate for EB amended COx treated with 20 mg.l<sup>-1</sup> of thymol that was lower than without thymol. Oxalate concentrations in leachates were significantly higher for amended COx with 0.2 mg.l<sup>-1</sup> of thymol than for the other concentrations. At 88 days, gluconate and succinate were not found, pyruvate and formate were still detected within the same range of concentrations, and acetate concentration was higher than at day 1. Short chain organics acids such as propionate, lactate and butyrate that were not detected at day 1, were dominant at day 88. Formate and pyruvate concentrations in leachates were significantly lower for COx leached with 2 mg.l<sup>-1</sup> and 20 mg.l<sup>-1</sup> of thymol respectively.



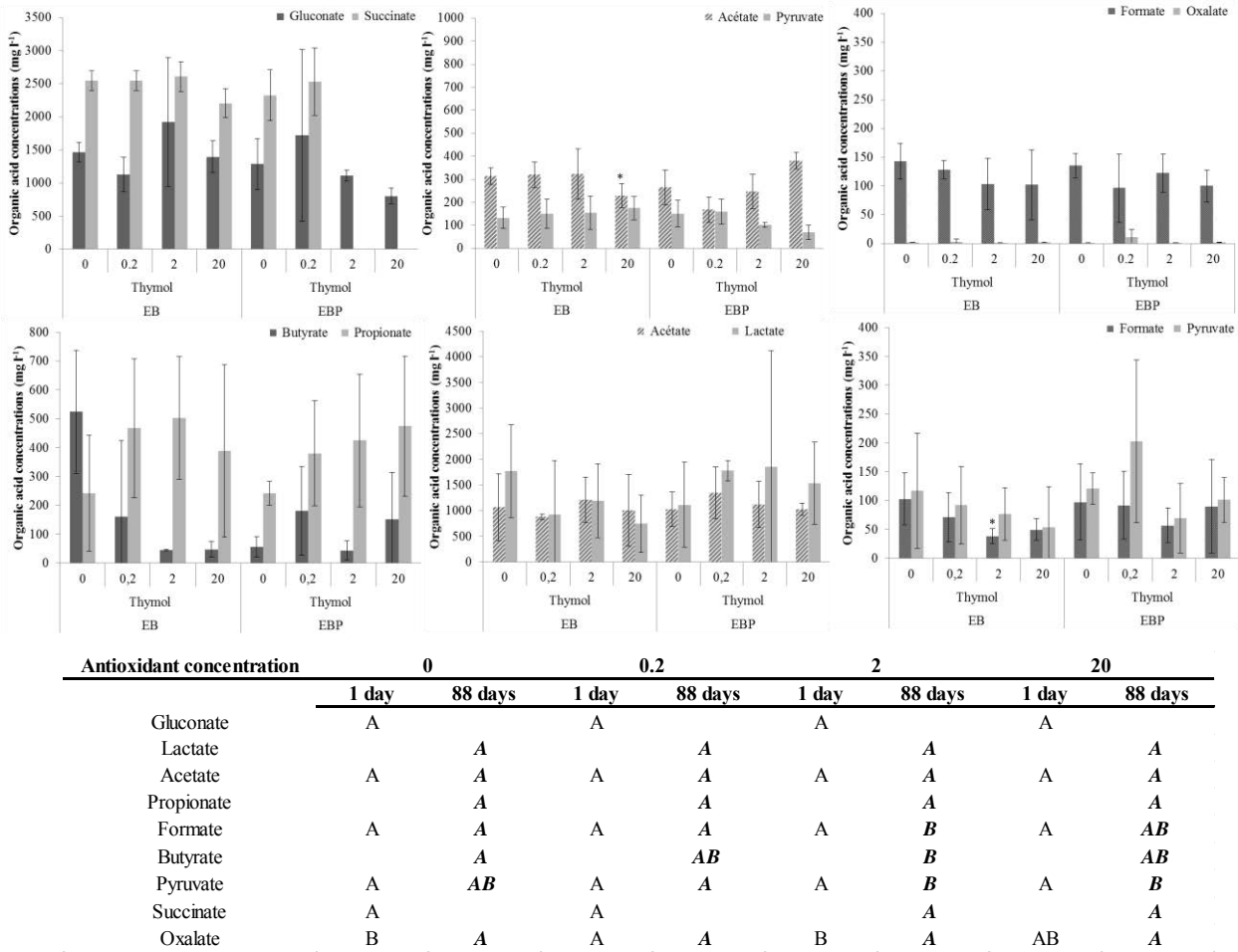


Figure 38 : Concentration profiles of short-chain organic acids in the COx leachates ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) after 1 day (upper graphs) and 88 days (lower graphs) of incubation. COx amended with: artificial root exudates and bacteria (EB); artificial root exudates and bacteria, and pyrite (EBP) and with thymol at four concentrations (0; 0.2; 2 and 20  $\text{mg.l}^{-1}$ ). Mean  $\pm$  standard deviation ( $n=4$ ). Results of the two ANOVA and post-hoc test (antioxidant and treatment) are shown in the table below. For each organic acid, mean values with the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ) For each organic acid, mean values with “\*” are significantly different from control ( $p < 0.05$ )

## 2.4 Discussion

As noted in the introduction, our hypothesis was that antioxidant amendments would affect bacterial activities and mineral leaching processes. However, the effect of pyrite and antioxidant amendments on leaching processes was limited. Artificial root exudate solution affected more significantly bacterial density and physico-chemical processes in argilite.

### 2.4.1 Effect of Artificial Root Exsudates (ARE) on bacterial activity

The availability of rich-carbon sources provided by ARE solution increased significantly the bacterial density (Figure 37) and physico-chemical processes in argilite (Figure 34 and Figure 35). The consumption of either monosaccharides or disaccharides contained in ARE solution

by microorganisms generated an excess of protons that can markedly lower pH of COx samples (Figure 34). Despite the presence of carbonates leading to a good buffering capacity (Gaucher et al., 2004; Lerouge et al., 2011), the pH of COx amended with ARE decreased significantly, whereas pH of pyrite amended samples remained similar to those of the control. So, the oxidation of rich-carbon sources generated more protons released than pyrite oxidation.

Short-chain organic anions, such as acetate, formate, oxalate, pyruvate and succinate were identified and quantified in the leachates. Except for succinate, which was provided by ARE solutions, the other molecules were acidic intermediates of Krebs cycle. They were due to incomplete aerobic degradation of carbohydrates leading to the excretion of various low molecular weight carboxylic acids in the medium (Obenosterer et al., 1999). During the leaching experiment, they accumulated markedly in the porosity of argilite sample and acidified the media. After 1 day, large amounts of gluconate, succinate, acetate, pyruvate and formate were detected (Figure 38) and may be responsible for the aforementioned acidification. Their presence suggested also an enhanced microbial activity in the COx sample supplemented with ARE. There was no significant effect of pyrite amendments, in terms of the spectrum of organic acids and quantities released. The absence of lactate or propionate indicated that fermentative bacteria or facultative anaerobes were not active. This indicated a likely sufficient oxygenation of the media, which was also confirmed by the presence of gluconate, one of metabolites produced by some aerobes oxidizing glucose. Previous works have shown that partial glucose oxidation can lower pH via the production of gluconic acid (Welch & Ullman, 2000; Wu et al., 2008; Balland et al., 2010).

After 88 days, at the end of the incubation, organic acids were always present in the leachates, but the quantitative profile was quite different. Some early produced metabolic by-products (succinate and gluconate) were completely consumed whereas the concentration of acetate was maintained at a high level. The presence of both propionate and butyrate suggested oxygen limitation, and the presence of acetate and lactate to a high level also argues in favour of higher fermentative activities of facultative anaerobes. Such acidifying fermentation activities of bacterial communities could also be responsible for the pH decrease during the incubation.

#### *2.4.2 Anti-microbial action of thymol and its consequences on bacterial metabolism*

The addition of thymol modified the metabolic profile of bacterial community and the organic acid composition of the leachates (Figure 38). The concentration of gluconate and succinate

were lower when thymol concentration was high at day 1, possibly due to a reduction of bacterial abundance or activity as shown by the significant decrease of the 16S rDNA gene copy number (Figure 37). The anti-microbial action of phenolic terpenoids was shown by (Lambert et al., 2001; Picone et al., 2013). They found that glucose tended to accumulate when *E. coli* cells were treated with carvacrol, an isomer of thymol. In contrast, organic acid concentration significantly decreased when carvacrol concentration was increased. The addition of ARE also increased the 18S rDNA gene copy number, but the effect of thymol on fungal abundance was not clear. Thymol, carvacrol and other phenolic terpenoids are known to affect the bacterial cell fitness, causing structural and functional damage to their membranes (Sikkema et al., 1995; Helander et al., 1998; Cowan, 1999). The effect of thymol on fungal species is not well documented.

#### 2.4.3 *Mixed effects of ARE and thymol on solubilisation of elements and mineral leaching*

The investigations carried out with the COx samples amended or not with pyrite showed the release of sulphate arising from pyrite oxidation (Figure 36 and Table 13). However, the oxidation process of iron sulphides was found to be relatively slow. Soluble iron was only detected in presence of exudates (EB and EBP), and always to a low level, less than 2‰ of initial content after 3 months (Table 14).

Indeed, most of 6 % of the initial sulphur pool were leached in control COx, whatever the thymol concentration used. The amendments of ARE and pyrite significantly decreased sulphur leaching percentage. Despite a larger sulphur pool, sulphur losses from COx amended with pyrite were significantly lower than sulphur loss from control COx (Table 13). This result suggests that the amended ground pyrite (particle size < 20 µm) was less sensitive to oxidation compared to pristine framboidal pyrites from COx. Due to a higher reactive surface, pristine pyrite was air-oxidized more efficiently. This is the first step of the COx alteration (Charpentier et al., 2001). Following this oxidation process, protons were released and induced local acidification. However, as mentioned above, the acidification process of pyrite amended samples remained low (pH close to 7 or more) and similar to that observed with control COx whereas pH decreased significantly around 6.5 with ARE addition. Pyrite amendment decreased calcium, magnesium, strontium and sulphate leaching rates. However, pH variation observed for leachates of COx amended with EB and EBP indicated that the additions of ARE (EB) lowered pyrite effect on leaching rates, except for sulphate leaching rate.

The amendments of ARE significantly decreased the sulphur leaching percentage, but it was mainly significant when high concentrations of thymol were added (Table 13). At that high concentration of thymol, bacterial abundance was lower than without thymol, but still much higher than in the control COx. Thymol may be adsorbed on clay particles, and could move into clay layer in order to stabilize clay structure (Huang et al., 1977; Stumm, 1992). However, thymol alone had no effect, so the effect of ARE was predominant. Further, nearly 4 % of sulphur initial pool was leached in COx amended with pyrite whereas less than 2 % was leached in COx amended with EBP, whatever the concentration of thymol. The decrease of sulphur loss from COx amended with pyrite when exudates (ARE) and bacteria were added, suggests an apparent decreased weathering of initial pyrite from COx and spiked pyrite.

Aluminium leaching rate increased in COx amended with ARE whatever the thymol concentration. Proton and organic anion releases, such as acetate and oxalate were certainly the main factors that could explain the aluminium extraction from aluminosilicates (Golubev et al., 2006). The large amounts of organics acids resulting from microbial degradation of carbohydrates would lead also to metal complexes that maintain iron and aluminium in a soluble form at pH close to the neutrality (Balland et al., 2010).

A decrease of calcium, potassium, magnesium, and strontium leaching rates were observed in COx amended with EB or EBP. However, the leaching percentage (Table 14) for these elements was increased in comparison with the control COx. The latter results are coherent with the increase of proton release promoted by ARE and the large amounts of acidic metabolites produced by bacterial community. Released protons and metabolites may also enhance the dissolution of calcite and subsequently, the leaching rate of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) and strontium ( $\text{Sr}^{2+}$ ).

This apparent discrepancy of the results with ARE could be due to the formation of biofilm, which might interfere with the weathering effect of protons and metabolites. Indeed, the mechanical difficulties encountered during vacuum filtration of leachates and the slim layers observed on COx surfaces at the end of incubation suggested the existence of growing up biofilms. Commonly, the formation of biofilms aid survival of microorganisms. The exopolymeric matrix (EPS) can sorb, bind or entrap many soluble and insoluble metal species as well as clay minerals or iron oxides (Gadd, 2007). EPS can complex metals and can enhance also aggregation of clay mineral particles or the weakening the mineral lattice during

repeated wetting and drying cycles (Gadd, 2007; Tian et al., 2015). As a consequence, the polymeric matrix of biofilms formed in COx could induce a depletion of reactive surfaces of clays and carbonates, and entrap large amounts of single ( $K^+$ ) and double charged cations ( $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ...). Amino acids such as arginine provided by ARE, with a positive charge, might be adsorbed on clay mineral surfaces or intercalated into clay layer spacing (Henrichs & Sugai, 1993). Thus, polymeric bacterial biofilm might play an important part in metal and macronutrients ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  ...) sequestration. Such polymeric matrixes and coatings play a crucial role in nutrient acquisition by plants growing in low nutrient soils. Because of the high concentrations of carbon sources, the dissolution rates of minerals are locally higher and benefit for root uptake (Evans & Anderson, 1990; Jones, 1998; Marschner, 2012). Additionally, in the present work, these acids interact also with insoluble calcium-iron-phosphates and release small quantities of phosphorus (Table 13). The formation of biofilm could be also a response to nutrient starvation and probably phosphorus-starvation.

## 2.5 Conclusion

Our results showed that thymol at the highest tested concentration significantly decreased microbial abundance, decreased the concentration of some organic acids produced at the beginning of the experiment, and decreased the sulphur leaching percentage. However, these effects were not observed with the control COx, but were only observed when ARE and a bacterial inoculum were added. The direct contribution of the latter to COx weathering and to the leaching of mineral elements was significant via the release of protons and metabolites and the pH decrease. However, due to rich-carbon sources provided by ARE, the formation of biofilm probably contributed to decrease sulphur leaching. The impact of organic compounds on the mineral weathering depletion could be further studied in order to understand regulation mechanisms and processes. A finer examination of complex polymeric matrixes such as the biofilms in COx is needed. However, complex interactions between antioxidants, microorganisms and COx occurred in that experiment and would probably occur in situ with plants producing such compounds.



## Chapitre V. Essais *in situ* – Végétalisation d'une verse d'argilite âgée par la lavande et le lavandin

---





Dans les chapitres précédents, l'effet de molécules antioxydantes modèles d'origine végétale et des exsudats sur la transformation de l'argilite du COx a été étudié au laboratoire dans des dispositifs simulant des percolations dans l'horizon de surface d'une verse, en conditions oxygènes. Ces expériences en microcosmes ont été réalisées sur des temps relativement courts (3 mois) et sans plantes. Les solutions d'antioxydant étaient apportées pour simuler l'apport de molécules aromatiques par les parties foliaires des lamiacées en surface du COx. L'apport de solutions carbonées et azotées synthétiques était destiné à simuler les modifications chimiques engendrées par l'exsudation racinaire d'une plante au sein du COx.

Néanmoins, ces expériences ont montré des effets complémentaires ou antagonistes de ces deux types d'apport : (1) une diminution du taux de lixiviation des éléments métalliques associés aux sulfures, i.e. fer et arsenic et des développements microbiens par des substances antioxydantes (thymol) (2) un effet positif sur le taux de lixiviation des éléments métalliques associés aux silicates (aluminium) et surtout sur la croissance et le développement des bactéries autochtones et allochtones par des substances carbonées et azotées. Une diminution du pourcentage de sulfate lixivié a été mise en évidence en présence de thymol à 20 mg·l<sup>-1</sup> et d'exsudats, et en présence d'exsudats seuls pour le COx enrichi en pyrite.

Toutefois, la dynamique sur les temps plus longs et la répartition spatiale de ces processus à la fois physico-chimiques et biologiques liés à la croissance de la plante ne pouvaient pas être prises en compte et étudiée par les expériences en microcosmes. Par ailleurs, la capacité des plantes sélectionnées (i.e. lavandes et lavandins) à se développer sur une verse d'argilite, à coloniser le substrat en profondeur et à produire des molécules antioxydantes *in situ*, méritait d'être étudiée.

Afin d'apprécier l'intensité et la sélectivité des processus d'altération physico-chimiques et microbiologiques de l'argilite du COx en présence de lavandes, des essais *in situ* ont été réalisés sur une verse âgée localisée sur le site du CMHM à Bure (Chapitre II § 7). Les verses « jeunes », i.e. formées avec des déblais de COx frais, étant en cours de construction ou de terrassement, la verse âgée était la seule disponible pour des expériences de plantation de longue durée. En surface, cette verse ancienne, stockée à l'air libre depuis plus de 10 ans, est constituée d'une argilite remaniée et oxydée. En profondeur, sous quelques centimètres, on retrouve une argilite « fraîche » compacte prélevée lors du creusement des galeries. De plus, elle est soumise depuis plusieurs années aux intempéries, à l'érosion et à un flux de particules minérales (poussières) et d'agents chimiques et biologiques de toutes sortes générés par la

circulation des chargeuses, les travaux agricoles dans les champs voisins ou encore la dissémination aérienne de graines, spores et microorganismes. Le substrat de plantation n'est donc pas un matériau originel (COx frais) comme celui qui avait été utilisé jusqu'alors pour les expériences en microcosmes.

Dans un premier essai *in situ* (Chapitre V-1), deux espèces végétales, la lavande, *Lavandula angustifolia*, et le lavandin, *Lavandula x intermedia* « *grosso* », sélectionnées dans le chapitre 3 pour leurs capacités à se développer sur le COx et à synthétiser des composés antioxydants, ont été plantées sur la verse sur une période d'environ un an. Il s'agissait de tester leur capacité de survie et de croissance sur différents versants du dépôt d'argilite. Des mesures non destructives du développement des plantes, et de leur taux de survie ont été réalisées. Par ailleurs, des échantillons de COx prélevés au bout d'un an en présence et en absence de plantes ont fait l'objet d'analyses physico-chimiques (i.e. éléments minéraux lixiviables) et microbiologiques.

Dans un deuxième essai de végétalisation (Chapitre V-2), une parcelle densément plantée de lavandin, *Lavandula x intermedia* « *grosso* », et une parcelle non plantée ont été mises en place, avec un dispositif de récolte des eaux de ruissellement en bas de pente, dans le but d'observer l'impact d'une forte couverture aérienne et racinaire sur l'évolution physico-chimique et microbiologique du COx de la verse âgée. En plus de mesures écophysiologicals, des échantillons de végétaux ont été prélevés au bout d'un an pour analyser la synthèse de composés antioxydants (huiles essentielles). Des analyses microbiologiques du COx et chimiques des éléments minéraux dans les eaux de ruissellement de la verse et dans les lixiviats d'échantillons de COx prélevés ont été réalisées.

## 1 Essais préliminaires de végétalisation par la lavande et le lavandin

### 1.1 Introduction

La lavande, *Lavandula angustifolia* et le lavandin, *Lavandula x intermedia* « *grosso* » ont été utilisés pour les essais préliminaires de végétalisation d'une verse de d'argilite âgée. Les essais de végétalisation par la fétuque ou le lotier d'un analogue argileux de l'argilite (l'argile à Opalinus du Toarcien –Aalénien ; 175 Ma) avait montré qu'une implantation végétale était possible (Scholtus, 2003). Néanmoins la végétalisation de cette roche plus ou moins marneuse constituée d'argiles grises à noires riches en quartz, carbonates et sulfures conduisait à une altération rapide des concrétions calcaires riches en pyrite (FeS<sub>2</sub>) et sidérite (FeCO<sub>3</sub>). En revanche, l'effet des plantes sur l'évolution *in situ* physicochimiques et microbiologiques du matériau argileux par l'apport de substances aromatiques produites ou d'exsudats racinaires n'a pas été étudié. L'impact limitant ou stimulant de ces substances organiques sur la lixiviation des minéraux (e.g. minéraux sulfureux) a été montrée (Meline et al., 1996; Sorrenti, 2007) ainsi que la modification de l'activité des microflore des sols en conditions aérobies ou anaérobies (Berthelin et al., 1974).

### 1.2 Matériels et Méthodes

Les matériels et les méthodes utilisés pour la mise en place de ces premiers essais *in situ* de végétalisation de la verse âgée par des lavandes et lavandins ont été précédemment décrits dans le chapitre II § 2.7.3. Deux parcelles exposées respectivement au Sud et à l'Est ont été terrassées afin d'ôter la couche de COx oxydée de surface et d'obtenir des tables et des pentes (2:1) de verses identiques pour les deux expositions. Les lavandes utilisées ont été obtenues à partir de trois pratiques culturales différentes : des plants de *Lavandula angustifolia* (lavande), obtenus au laboratoire par germination en phytotron de graines prétraitées à l'acide gibbérellique à 200 mg.l<sup>-1</sup>, soit (1) sur du COx frais ou (2) sur terreau irriguées quotidiennement de solution de Hewitt (Hudson, 1967). (3) Des plants de *Lavandula x intermedia* « *grosso* » (lavandin) achetés en pépinière et issus de bouturage sur terreau amendés en engrais au rempotage (osmocote) et irrigués à l'eau.

Après le terrassement des pentes et la mise à niveau de la table des parcelles Sud et Est, 54 plantes ont été réparties selon cinq modalités et plantées à distance de 60 cm sur les deux parcelles : lavandes germées sur COx (1), lavandes ou lavandins issus de boutures sur terreau et dont du terreau a été ajouté lors de la plantation (2, 3), lavandes ou lavandins issues de

boutures sur terreau et dont les racines ont été rincées et placées directement dans le COx sans ajout de terreau (2',3'). La plantation a été réalisée en juillet 2013 et une irrigation quotidienne, par arrosage à l'eau des parcelles a été réalisée par l'Andra. Des mesures de hauteurs et de diamètres des plants ont été effectuées tous les quinze jours et des photographies ont été prises régulièrement. Après 276 jours, des prélèvements destructifs de lavandins en triplicats ont été effectués pour réaliser des pesées de matières fraîches et sèches (Chapitre II § 8.3), des mesures de paramètres de mycorhization et d'abondance microbienne (Chapitre II § 8.1). Des prélèvements de COx en triplicats ont été réalisés à deux profondeurs, en surface (P1) et à 30 cm de profondeur (P3) (Chapitre II § 7.5) afin de quantifier les éléments anioniques et cationiques disponibles du COx (Chapitre II § 10).

### 1.3 Résultats

#### 1.3.1 *Survie et croissance des lavandes et lavandins sur les verses*

En raison d'un faible taux de germination des graines de lavande sur COx, 54 plantes (lavande et lavandin) au lieu de 60 ont été réparties en trois blocs par exposition (Sud et Est) et par position sur la verse (table et pente). Aucun plant de lavande germé sur COx, n'a été repiqué sur les blocs exposés à l'Est (Tableau 15).

Dès 38 jours après la plantation, de nombreuses jeunes plantules de lavande (19/30) germées sur terreau et sur COx ont succombé aux fortes chaleurs de l'été, malgré l'irrigation mise en place. Le taux de mortalité de ces plants âgés de 1 mois lors du repiquage (juillet 2013), atteint 67% après 68 jours soit 2/3 des plants de lavande installés initialement. Il reste stable et n'évolue plus au-delà. Cette mortalité affecte tous les plants de lavande quelles que soient leur condition de culture initiale (sur terreau ou COx) ou leur modalité de repiquage (racines nues ou non).

Toutefois, on observe un effet « pente » significatif, quel que soit le traitement et l'orientation de la parcelle. Le développement et la survie des lavandes sont fortement diminués dans les pentes. Après 68 jours, il n'y a plus de lavandes viables sur les pentes. Les plantes installées sur les tables résistent mieux à la sécheresse et aux conditions d'expositions.

L'orientation de la parcelle joue aussi. Les lavandes issues de semis sur terreau et placées directement dans le COx sur le versant Sud ont un taux de survie plus important que celles implantées sur le versant Est, et se développent mieux sur la table que dans la pente.

A l'inverse, le développement du lavandin n'est pas affecté par l'orientation de la parcelle ou la pente. Leur survie est identique sur la pente et la table de la verse, sur la partie exposée au

Sud et à l'Est. Le taux de mortalité est nul, toutes les plantes ont résisté. Il n'y a aucun effet du mode de repiquage (avec ou sans terreau), les lavandins implantés directement dans le COx ou avec terreau survivent aussi bien, sur les pentes et sur les tables de la verse, et quelle que soit l'exposition, Est ou Sud.

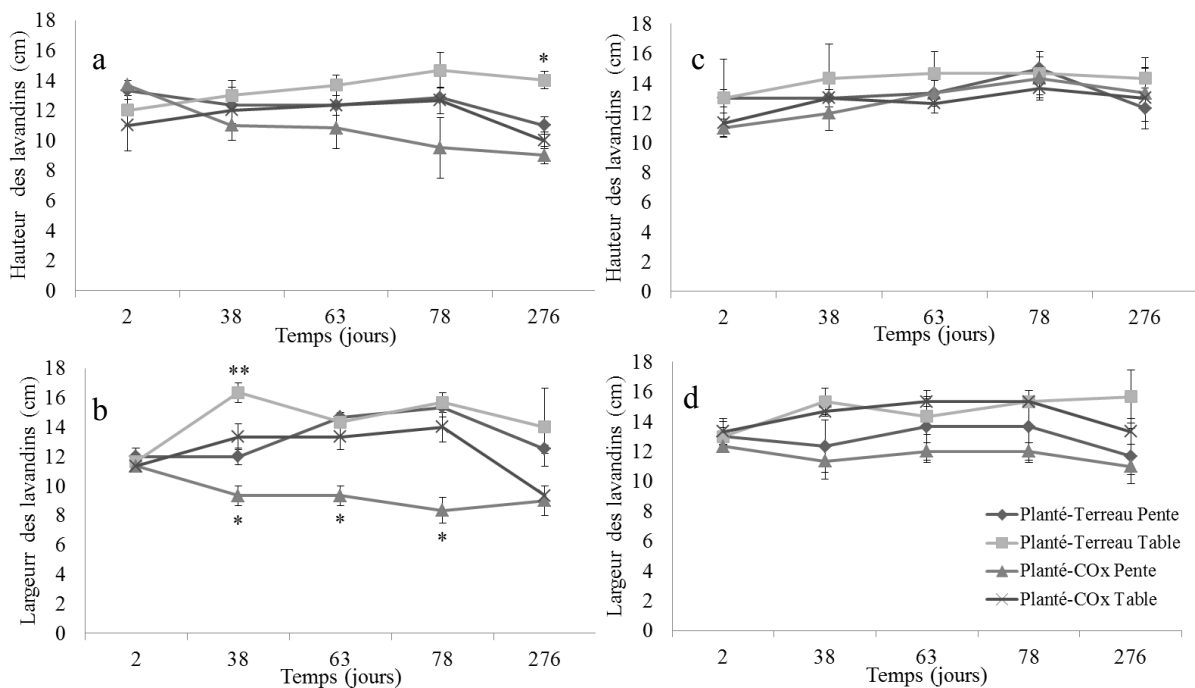
*Tableau 15 : Nombre de plants ayant survécu au cours du temps sur la verse âgée en fonction de l'espèce (lavande ou lavandin), du mode de pré-culture (germée sur COx ou terreau, bouturage sur terreau), de plantation (racines nues ou avec ajout de terreau lors de la plantation) et de l'orientation (table ou pente, Est ou Sud)*

Modalités	Temps (jours)	Sud		Est		Taux de survie	
		Table	Pente	Table	Pente	Table	Pente
Lavande germée sur COX	2	3	3	(-)	(-)	100 % (3/3)	100 % (3/3)
	38	3	1	(-)	(-)	100 % (3/3)	33 % (1/3)
	63	3	0	(-)	(-)	100 % (3/3)	0 % (0/3)
	78	3	0	(-)	(-)	100 % (3/3)	0 % (0/3)
	276	3	0	(-)	(-)	100 % (3/3)	0 % (0/3)
Lavande germée sur terreau	2	3	3	3	3	100 % (6/6)	100 % (6/6)
	38	2	0	2	0	67 % (4/6)	0 % (0/6)
	63	2	0	2	0	67 % (4/6)	0 % (0/6)
	78	2	0	2	0	67 % (4/6)	0 % (0/6)
	276	2	0	2	0	67 % (4/6)	0 % (0/6)
Lavande germée sur terreau racines nues	2	3	3	3	3	100 % (6/6)	100 % (6/6)
	38	3	0	0	0	50 % (3/6)	0 % (0/6)
	63	3	0	0	0	50 % (3/6)	0 % (0/6)
	78	3	0	0	0	50 % (3/6)	0 % (0/6)
	276	3	0	0	0	50 % (3/6)	0 % (0/6)
Lavandin planté avec terreau	2	3	3	3	3	100 % (6/6)	100 % (6/6)
	38	3	3	3	3	100 % (6/6)	100 % (6/6)
	63	3	3	3	3	100 % (6/6)	100 % (6/6)
	78	3	3	3	3	100 % (6/6)	100 % (6/6)
	276	3	3	3	3	100 % (6/6)	100 % (6/6)
Lavandin planté sans terreau	2	3	3	3	3	100 % (6/6)	100 % (6/6)
	38	3	3	3	3	100 % (6/6)	100 % (6/6)
	63	3	3	3	3	100 % (6/6)	100 % (6/6)
	78	3	3	3	3	100 % (6/6)	100 % (6/6)
	276	3	3	3	3	100 % (6/6)	100 % (6/6)
<b>Taux de survie (276j)</b>		<b>93% (14/15)</b>	<b>40% (6/15)</b>	<b>67 % (8/12)</b>	<b>50% (6/12)</b>		

(-) parcelles non plantées

Un effet significatif de l'exposition (Est/Sud) est observé sur les caractéristiques morphométriques des lavandins (Figure 39). La hauteur des plantes exposées à l'Est est significativement inférieure à celle des plantes exposées au Sud à partir de 78 jours. De plus, à l'Est, les lavandins plantés avec un ajout de terreau sur la table de la verse ont une hauteur

significativement plus importante que les autres modalités à 276 jours. Des jours 38 à 78, les plantes mises en place sur la table de la verse sont plus larges que celles plantées sur la pente de la verse. À partir du 38<sup>ème</sup> jour, ces résultats montrent une croissance des plantes en largeur plus importante lorsqu'elles sont implantées avec un apport de terreau avec une largeur significativement plus faible pour les plantes de la modalité sans terreau exposées à l'Est sur la pente comparé aux autres modalités. Cependant, toutes modalités et facteurs confondus, nous n'observons plus de différences significatives de largeur et de hauteur des plantes au bout du 276<sup>ème</sup> jour d'expérience.



Temps (jours)	Paramètres	Exposition		Référentiel		Substrat	
		Sud	Est	Table	Pente	COx	Terreau
2	Largeur	A	B	A	A	A	A
	Hauteur	A	A	A	A	A	A
38	Largeur	A	A	A	B	B	A
	Hauteur	A	A	A	A	A	A
63	Largeur	A	A	A	B	B	A
	Hauteur	A	A	A	A	A	A
78	Largeur	A	A	A	B	B	A
	Hauteur	A	B	A	A	A	A
276	Largeur	A	A	A	A	B	A
	Hauteur	A	B	A	A	A	A

Figure 39: Mesures des hauteurs et largeurs des lavandins plantés sur la verse âgée et exposés à l'Est (a,b) ou au Sud (c,d) au cours du temps. Planté-Terreau: boutures pré-cultivées sur terreau avec ajout de terreau lors de la plantation; Planté-COx: boutures pré-cultivées sur terreau dont les racines ont été rincées pour retirer le terreau avant la plantation. Moyenne  $\pm$  écart type (n=3). Pour chaque jour, les astérisques indiquent des différences significatives entre les moyennes. Les résultats de l'ANOVA à trois facteurs et les tests post-hoc sont représentés dans le tableau en dessous. Pour chaque modalité (exposition, référentiel et substrat), des lettres différentes indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ).

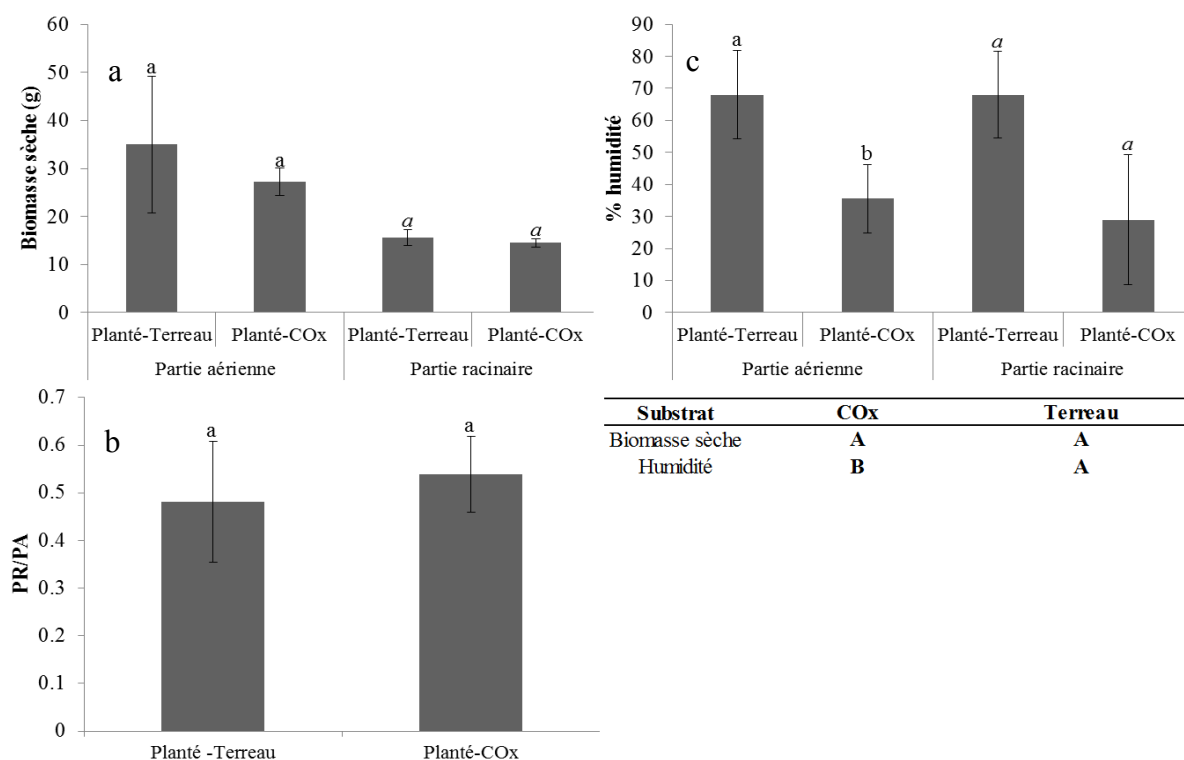


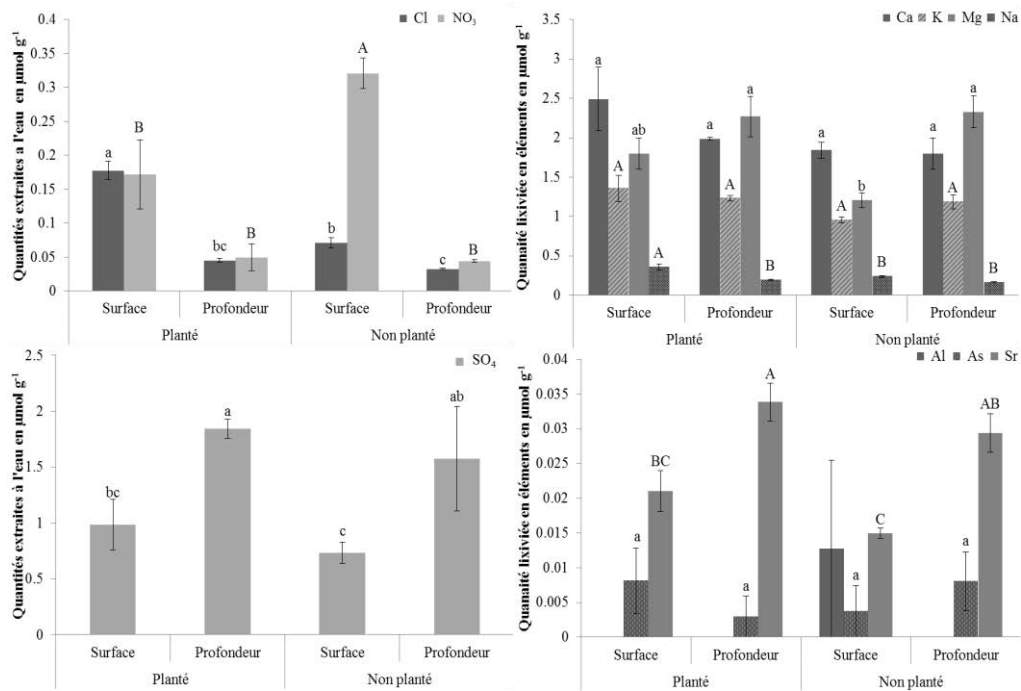
Figure 40: Biomasses sèche des parties aériennes et racinaires (a), rapport entre la biomasse sèche racinaire et aérienne (b), et pourcentage d'humidité (c) des lavandins plantés sur verse avec ou sans (racines rincées avant plantation) terreau et prélevés après 276 jours.

Il n'y a pas de différences significatives entre les quantités de biomasses racinaires ou aériennes des lavandins plantés avec et sans terreau (Figure 40a). L'absence de terreau au niveau des racines n'a pas d'effet significatif sur la croissance de la plante. En revanche, les teneurs en eau des parties aériennes sont significativement plus élevées pour les plants avec terreau. Le taux d'humidité relative des parties aériennes des lavandins plantés directement sur le COx est diminué de moitié. Pour les parties racinaires la tendance est similaire avec un effet positif de la présence de terreau sur la teneur en eau des racines. On constate une diminution de moitié comme pour les parties aériennes, mais la différence n'est pas significative en raison d'incertitudes trop importantes (Figure 40c). Enfin, le rapport de la biomasse racinaire sur la biomasse aérienne (PR/PA), qui décrit le mode d'allocation du carbone organique des parties aériennes aux racines ne varie pas en fonction de la présence ou non de terreau lors de la plantation (Figure 40b).

### 1.3.2 Effet de la présence de lavandins sur les éléments lixiviables du Cox

En raison du taux de mortalité *in situ* important des lavandes cultivés sur COx et de tailles plus petites (i.e. plants plus jeunes), les essais de lixiviation des éléments minéraux ont été

réalisés uniquement sur des lavandins pré-cultivés sur terreau dont les racines ont été rincées avant la plantation. Les quantités d'éléments lixiviables de l'argilite en présence de lavandins et à différentes profondeurs (2 cm et 30 cm) sont comparées à celles obtenus sur des échantillons d'argilites prélevées dans des zones « non plantées ». Ces échantillons prélevés dans le voisinage immédiat de la plante et à quelques dizaines de centimètres des précédents, servent de référence géochimique.



Effet plante	Planté	Non planté	Effet profondeur	Surface	Profondeur
Cl	A	B	Cl	A	B
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	B	A	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	A	B
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	A	A	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	B	A
Ca	A	A	Ca	A	A
K	A	A	K	A	A
Mg	A	A	Mg	B	A
Na	A	B	Na	A	B
Al	A	A	Al	A	A
As	A	A	As	A	A
Sr	A	A	Sr	B	A

Figure 41 : Quantités lixiviables à l'eau de chlorure (Cl), nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), sulfates (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), calcium (Ca), potassium (K), magnésium (Mg), sodium (Na), aluminium (Al), arsenic (As), strontium (Sr) en µmol/g d'argilite sèche prélevée à 276 jours en surface (P1- 2 cm) ou en profondeur (P3-30 cm) sur verse âgée végétalisée par des lavandins pré-cultivés sur terreau dont les racines ont été rincées avant la plantation. Les résultats de l'ANOVA à deux facteurs et les tests post-hoc sont présentés dans le tableau joint. Pour chaque élément, les valeurs moyennes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes (p<0,05).

Comme le montre la Figure 41, les quantités lixiviables à l'eau de calcium et de potassium, d'arsenic et d'aluminium sont similaires en présence ou non de plantes et ne dépendent pas de la profondeur. En revanche, les quantités de sodium et de chlore lixiviables sont significativement plus importantes pour le COx de surface et planté par rapport aux autres



modalités. A l’opposé, les quantités de magnésium et de strontium lixiviées sont identiques pour l’argilite planté et non planté, mais significativement inférieures en surface par rapport à la profondeur. Les quantités de nitrates lixiviées sont significativement plus faibles en profondeur pour les échantillons plantés. Les quantités de sulfates lixiviées sont identiques pour le COx planté et non planté, mais sont significativement plus faibles en surface.

### 1.3.3 Effet de la présence de plantes sur l’abondance microbienne dans le COx de la verse

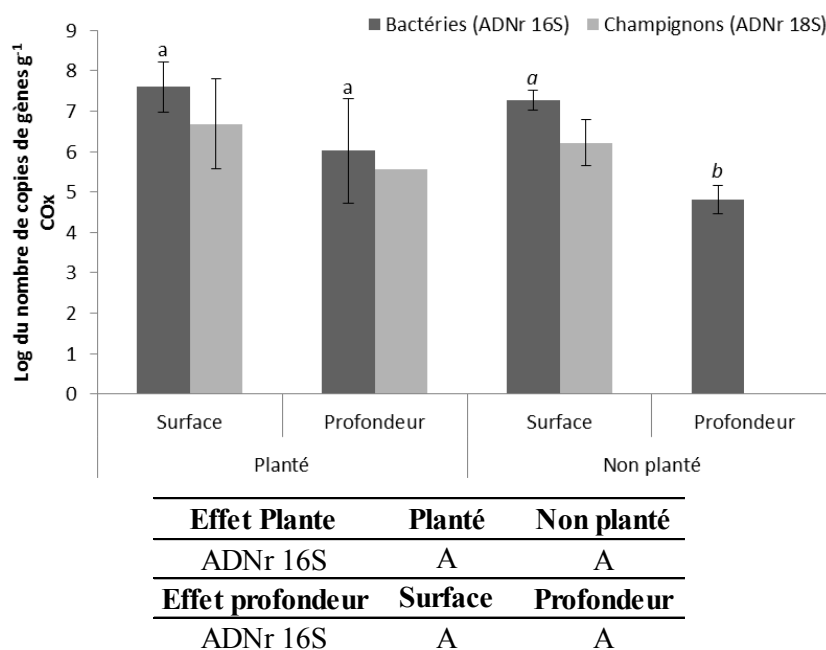


Figure 42 : Nombre de copies de gènes bactériens (16S) et fongiques (18S) par gramme de COx sec prélevé sur la verse végétalisée par des lavandins pré- cultivés sur terreau avec les racines rincées avant plantation, ou témoin non plantée, prélevé en surface ou à 30 cm de profondeur après 30 jours. Les résultats de l’ANOVA à un facteur (surface ou profondeur) pour les modalités « planté » ou « non planté » sont représentées sur le graphique. Les résultats de l’ANOVA à deux facteurs et les tests post-hoc sont présentés dans le tableau en dessous. Les valeurs moyennes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

L’analyse des résultats par ANOVA à deux facteurs montre que le nombre de copies de gènes d’ADNr 16S n’est pas significativement différent entre l’argilite plantée et non plantée, et ne montre pas d’effet significatif de la profondeur prélèvement (Figure 42). Cependant, pour le COx non planté, le nombre de copies de gènes d’ADNr 16S est significativement plus faible en profondeur comparé à la surface.

Comme pour les gènes 16S, le nombre de copies de gènes fongiques (18S) n’est pas significativement différent en surface pour le COx planté ou non planté. En revanche, en profondeur, le nombre de copies de gènes d’ADNr fongique quantifié est faible et n’a été quantifiable que pour une seule répétition en présence de plantes. En absence de plantes, le nombre de copies de gènes d’ADNr 18S n’était pas quantifiable en profondeur.

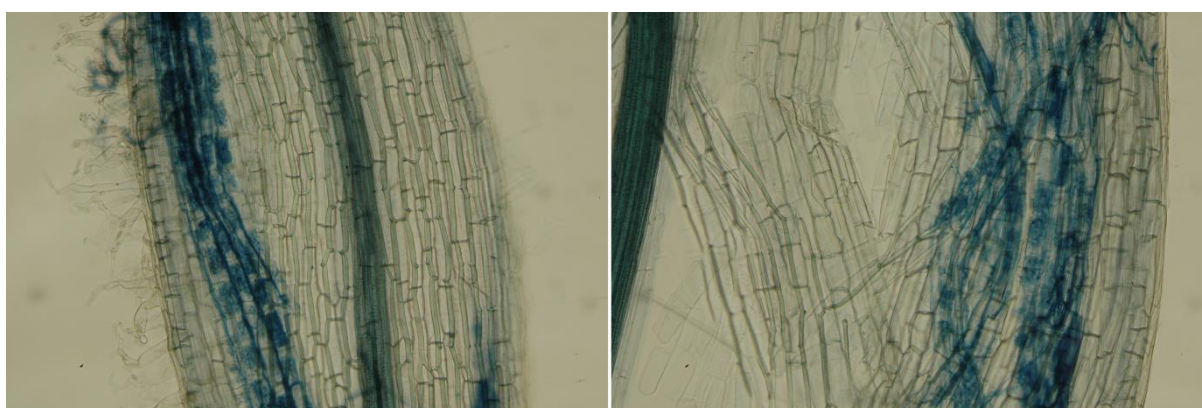


Figure 43: Racines de lavandins pré-cultivés sur terreau, dont les racines ont été rincées avant plantation, prélevées 276 jours après plantation sur la verse âgée et montrant des arbuscules de champignons mycorhiziens. Elles ont été colorées au bleu trypan et observées sous microscope optique (grossissement  $\times 100$ ).

Le prélèvement de racines de lavandins sur la verse plantées après 276 jours et leur coloration au bleu trypan a permis de mettre en évidence une forte colonisation mycorhizienne des racines, avec la présence de mycélium et d'arbuscules (Figure 43). Ainsi la fréquence de mycorhization des racines est de l'ordre de 40 à 70%, et 10 à 40% de la longueur racinaire est occupé par des structures mycorhiziennes (Tableau 16). L'analyse statistique des données montre que tous les paramètres mesurés de mycorhization (fréquence et intensité des hyphes ou des arbuscules) ne sont pas significativement différents, que les lavandins aient été plantés avec du terreau ou rincés avant plantation (Tableau 16).

Tableau 16: Paramètres de mycorhization des lavandins, plantés avec terreau ou avec racines rincées, sur la verse âgée et prélevés après 276 jours de culture

	Mycorhization		Teneur en arbuscules	
	Fréquence (F) en %	Intensité (M) en %	Partie mycorhizée (a) en %	Système racinaire (A) en %
Lavandin-COx	67 ( $\pm 55$ ) A	42 ( $\pm 37$ ) A	5 ( $\pm 4$ ) A	1 ( $\pm 1$ ) A
Lavandin-Terreau	38 ( $\pm 34$ ) A	8 ( $\pm 8$ ) A	23 ( $\pm 35$ ) A	4 ( $\pm 6$ ) A

#### 1.4 Discussion

Les résultats obtenus montrent des différences très sensibles de survie des espèces de plantes, lavande et lavandin, entre les deux expositions (Est/Sud), le positionnement (table/pente) et le mode de culture et de plantation (germination, bouturage, avec et sans terreau). La survie des lavandes est limitée aux tables, alors que le lavandin semble mieux survivre. Quel que soit le mode de culture, le lavandin survit aussi bien sur la pente que sur la table. La vivacité des plants de lavandin issus de bouturages sur terreau est supérieure aux plants de lavande obtenus par semis sur terreau et plantées avec ajout de terreau, ou directement dans l'argilite.

Le fourreau racinaire du lavandin plus dense facilite son implantation. Le drainage intense et la saturation hydrique moindre de l'argilite sur les versants accentue le taux de mortalité des lavandes exposées à l'Est. La forte mortalité des jeunes plantules de lavandes pourrait aussi s'expliquer par des apports conséquents de particules d'argiles lors de fortes pluies, qui sont charriées et viennent s'accumuler au niveau des feuillages denses des lavandes. La diminution du rendement photosynthétique conduit à la mort des plantes les plus petites ou les plus faibles. Burylo et al. (2012) ont démontré en laboratoire que *Lavandula angustifolia* pouvait piéger 2 g de sédiment par cm<sup>3</sup> de feuillage, mais n'ont pas étudié l'impact du captage des sédiments sur l'écophysiologie des plantes étudiées. La présence de stolons d'une plante endémique des versées, *Tussilago farfara*, peut aussi affecter le développement racinaire des lavandes et/ou consommer l'eau nécessaire à leur développement.

Toutefois, les constantes physiologiques des plantes, lavande et lavandin, ne sont pas affectées par le substratum argileux. L'allocation du carbone organique des parties aériennes aux racines indiquée par des ratios PR/PA compris entre 0,38 et 0,50 pour les lavandins est similaire à celle rapportée chez trois espèces de lavandes, *Lavandula stoechas*, *L. dentata* et *L. multifida*, en conditions contrôlées de laboratoire sur sol sablonneux (Ouahmane et al. 2006). De même, les pourcentages d'humidité rapportés par Marulanda et al. (2007), mesurés pour les parties aériennes et racinaires des lavandes mycorhizées, sont comparables aux valeurs mesurées dans notre étude. Ces indices, comparables à ceux observés pour les lavandins prélevés sur la versée après 276 jours, mettent en évidence que les lavandins auraient tous les éléments nutritifs nécessaires à leur développement. De plus, les analyses réalisées sur les racines ont montré une mycorhization significative des lavandins après 276 jours de culture sur la versée (Figure 43 et Tableau 16). En condition de laboratoire, Ouahmane et al. (2006) ont obtenu des fréquences de colonisations mycorhiziennes comparables des racines de trois espèces de lavandes inoculées par *Glomus intraradices* : 48 %, 52 % et 55 % pour les racines de *Lavandula multifida*, *L. dentata* et *L. stoechas* respectivement. Cependant, à notre connaissance, la colonisation mycorhizienne de lavandins sur des substrats aussi pauvres et aussi différents d'un sol que l'argilite du COx, n'a jamais été observée. Ainsi, les conditions édaphiques présentées par les versées sont favorables à la mycorhization des racines de lavandins implantés directement sur le COx.

Les analyses microbiologiques, réalisées uniquement après 276 jours de culture sur la versée, ne permettent pas d'apprécier l'évolution de l'abondance ou de l'activité microbienne du sol au cours du temps et en présence de lavandin (Figure 42). Cependant, il faut souligner que la densité bactérienne et fongique en surface, et même à 30 cm dans le COx planté, atteignent

des niveaux comparables à celles de sols fertiles ( $10^6$  à  $10^9$  bact.g<sup>-1</sup>). Dans le COx non planté et à 30 cm, la densité bactérienne semble plus faible et nous n'avons pas quantifié de gène fongique, ce qui suggère un effet positif de la rhizosphère de la lavande ou du lavandin sur le développement des communautés bactériennes. Duponnois et al. (2011) ont mis en évidence cette capacité « facilitatrice » de la lavande stéchade, *Lavandula stoechas*. L'introduction de lavandes conduirait à une induction de croissance de *Pseudomonas fluorescens* par le développement d'hyphes mycorhiziens (Ramanankieran et al., 2006).

Les analyses élémentaires sur les lixiviats d'argilite rhizosphérique ont permis de mettre en évidence le rôle inhibiteur significatif du végétal sur la disponibilité d'éléments, tels que le chlore et le sodium. La rétention du chlore a déjà été observée lors des expériences menées en présence d'exsudats synthétiques. Cette tendance est confirmée pour d'autres éléments comme le calcium et le strontium qui demeurent retenus dans l'argilite dans les zones plantées. En revanche, aucun effet significatif des plantes n'a été observé sur des éléments métalliques majeurs (Al, Fe) ou des anions comme les sulfates, qui pourraient refléter l'altération des minéraux silicatés ou pyriteux constitutifs de l'argilite. Sierra et al. (2012) au sein de mines de mercure, sous culture de lavandes stéchades, ont montré des concentrations plus importantes de calcium, magnésium, sulfates et chlore disponibles (i.e. obtenus par AB-DTPA, Soltanpour & Schwab (1977)) dans des échantillons de sols rhizosphériques par rapport aux sols non rhizosphériques. Les processus écophysiologicals liées au métabolisme racinaire des lavandins (exsudats, modification du pH, apports de matières ou composés organiques) pourraient modifier la disponibilité et la lixiviation des éléments minéraux. Cependant, dans notre étude, la faible densité de plantation a certainement limité la portée spatiale des transformations induites par l'activité rhizosphérique. La diminution de la quantité de nitrates lixiviable du COx en présence de plantes pourrait être liée à son absorption par les racines. Des essais complémentaires mériteraient d'être menés avec une densité plus forte de plantes, afin qu'elles impactent plus fortement le ruissellement et la lixiviation des minéraux de l'argilite. Par ailleurs, la synthèse de composés antioxydants d'origine foliaire et racinaire par les lavandes et lavandins *in situ* n'a pas été estimée. Enfin, les analyses chimiques ont été réalisées sur des échantillons de COx prélevés puis lixiviés au laboratoire. Le suivi direct des eaux de ruissellement issues des verses est indispensable pour observer l'impact de la végétalisation sur la qualité physico-chimique des effluents.

### 1.5 Conclusions

Ce premier essai de végétalisation d'une verse de COx âgée a démontré les possibilités d'adaptation, le maintien et le développement des lavandes et lavandins sur un cycle de végétalisation complet de l'ordre de l'année. Au vu des résultats et du suivi de cette verse végétalisée, le lavandin s'est avéré plus rustique et résistant que la lavande. Ainsi, la modalité de plantation du lavandin sans ajout de terreau a été retenue pour la suite des essais *in situ*. L'implantation d'une végétation rustique et « facilitatrice » a permis de favoriser le développement d'une flore microbienne, de favoriser la colonisation mycorhizienne des racines et de modifier la disponibilité et la lixiviation de certains éléments minéraux de l'argilite. La mise en place et le suivi d'une verse densément végétalisée, comparée à une verse témoin non végétalisée, et des analyses complémentaires, devraient permettre de compléter les observations réalisées dans ce chapitre, notamment concernant l'évolution et l'altération physico-chimique et microbiologique du COx de la verse âgée.

## 2 Suivi d'une verse végétalisée par le lavandin

### **Phytostabilization of a Callovo-Oxfordian clay heap using *Lavandula x intermedia***

Dimitri Ubersfeld<sup>1,2</sup>, Christian Mustin<sup>1,2</sup>, Paul-Olivier Redon<sup>3</sup>, Corinne Leyval<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Université de Lorraine, LIEC, Faculty of Sciences and Technology, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

<sup>2</sup> CNRS, LIEC, Faculty of Sciences and Technology, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

<sup>3</sup> Andra, R&D Division, Route départementale 960 – BP 9, 55290 Bure, France

#### *2.1 Introduction*

Excavated geological materials for the construction of underground structures are deposited on soil surface. They form heaps where weathering processes occur under the influence of climatic, biotic and abiotic factors (Hirsch et al., 1995; Deneff et al., 2001; Wilson, 2004). To prevent the weathering and erosion of such materials, the use of plants can be considered.

At the Andra Underground Research Laboratory (URL, Bure, France) where the disposal of radioactive wastes in a deep clayey formation is investigated (Andra, 2005), large volumes of material from the geological layer of Callovo-Oxfordian clay (COx) have been excavated. The COx material excavated from 500 m below surface is submitted to new environmental and climatic conditions (oxic conditions, rainfall, temperature variation) and to potential biological colonization. The oxidation of pyrite sulfur is the first step of physico-chemical weathering of COx, leading to mineral element leaching (Charpentier et al., 2001). The pedogenetic evolution of the excavated COx will create new technosol as studied on similar geological material (Scholtus et al., 2015). The colonization by plants and microorganisms, via the synthesis and excretion of organic or inorganic compounds, also contributes to clay weathering (Leyval & Berthelin, 1991; Hinsinger, 1998; Hinsinger et al., 2003; Gadd, 2007). The experimental leaching of COx with organic compounds induced element leaching, clay mineral modification and precipitation of secondary minerals (Scholtus et al., 2009).

Plants also contribute to reduce soil erosion and runoff and are often considered for stabilization of material or soil, especially of mine tailings in metal contaminated areas (Elwell & Stocking, 1976; Bochet et al., 1998). Plant covers also create a more pleasant

landscape compared to bare soil or substrate. Although this material is not contaminated, phytostabilization can be considered for COx excavated material. The plants should be dense to prevent wind erosion, and should be able to colonize the COx heap and adapt to poor or no structure, to deficient supply of nutrients and to no or few microbial communities in COx (Chapter IV-1, Ubersfeld et al., submitted). Many studies have demonstrated the ability of *Lamiaceae* species to grow, reduce pollutant transfer and stabilize soils (Sierra et al., 2009, 2012; Parra et al., 2014). *Lamiaceae* species such as *Lavandula sp.* have been used to introduce plant covers in disturbed Mediterranean environments (Ouahmane et al., 2006a; Duponnois et al., 2011). *Lavandula sp.* are well known for their antioxidant and antimicrobial properties (Naik et al., 2010; Mickiene et al., 2012). Essential oil from leaves and flowers contains linalool, camphor, camphene and other antioxidant compounds, commonly used in agrifood and pharmaceutical sectors (Yanishlieva et al., 1999; Vázquez et al., 2001; Numanoglu et al., 2007; Perez-Alfonso et al., 2012). Moreover, Ubersfeld et al., (submitted) showed that antioxidant compounds from *Lamiaceae* family (i.e. thymol at 2 mg.l<sup>-1</sup>) decreased the sulfate leaching rate from the COx in a column experiment.

We hypothesized that such plants could contribute to reduce erosion and runoff from the COx, promote microbial community, and via the production of antioxidant compounds could reduce the weathering of the COx. Specifically, the aim of this study was to assess the establishment and growth of lavandins on a COx heap and the physico-chemical (e.g. element leaching) and biological (e.g. microbiological analyses) weathering of COx. This study took advantage of excavated COx that was piled on the excavation site. A COx heap was prepared for the field experiment, partially planted with *Lavandula x intermedia* (i.e. lavandin), known to synthesize antioxidant compounds in leaf and root tissues (Daferera et al., 2002; Anthony et al., 2012). Rainfall and leached elements were collected and analysed. Lavandin survival percentage and biomass were measured, and COx and plant samples were collected after one year to analyse plant antioxidant compounds, microbial communities (bacterial and fungal density, mycorrhizal root colonization), as well as as water extractable elements from COx in planted and unplanted COx samples.

## 2.2 Materials and Methods

### 2.2.1 *In situ experimental set-up*

A heap (approximately 40 m length, 15 m width, 3 m height) was set up in 2005 from the excavated Callovo-Oxfordian clay at the Andra Underground Research Laboratory (URL, Bure, France) where the disposal of radioactive wastes in a deep clayey formation is investigated (Andra, 2005). The composition of this Callovian-Oxfordian (COx) geological formation was 40 % clay (mainly interstratified illite/smectite), 20 % quartz, 30 % carbonate (mainly calcite), 5 % feldspar, less than 2 % pyrite, and 2 % of low mature organic matter (Gaucher et al., 2004; Clauer et al., 2007; Lerouge et al., 2011). The COx heap surface was leveled to obtain a flat area of 14 m<sup>2</sup> (i.e. 3.50 m wide and 4 m long) and a slope of 14 m<sup>2</sup> (i.e. 3.50 m wide and 4 m long with a slope angle of 63 ° (slope of 200 %)). Half of the flat and steep area were planted in June 2014 with lavandin (*Lavandula x intermedia grosso*, Le jardin d'Adoué, Lay-saint-Christophe, France). Roots of more than 12 month-old lavandin plants were washed with tap water in order to remove the breeding soil before planting in COx. One hundred lavandins were planted every 33 cm (quincunx) on the flat and steep part of the heap (7.1 plants/m<sup>2</sup>). Runoff water collecting devices were placed at the bottom of planted and unplanted steep area: a geotextile (Monarflex) was installed at the COx surface as a drain to collect the runoff water in a gutter (0.12 m x 4 m) connected to a container. Runoff waters were collected every 18 days on average.

### 2.2.2 *Plant and COx sampling and analyses*

Four plants and the COx around the roots were sampled on the flat part of the heap 351 days after planting. Roots and shoots were separated. Roots were rinsed with distilled water and both were dried at 60°C for 72 hours for dry biomass measurement (g). COx was sampled at the surface (2 cm) and at 15 cm depth on the planted and unplanted heap flat part. Water extractable mineral elements from these COx samples were obtained (10 g of COx with 40 mL of ultrapure water, with four replicates) and analysed for anion and cation concentrations, as for runoff water samples. Anion concentrations (sulphate, chloride, phosphate, and nitrate) were measured with a Dionex ICS-3000 ion chromatography system (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA). Isocratic separations of Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> were carried out using a polymeric surface-sulfonated analytical column (AS20, 4 mm x 50 mm) and a conductimetric detector. A reagent-free eluent generator (EGC II - KOH cartridge) was used



to generate potassium hydroxide eluent gradient at a flow-rate of 1 ml/min. The IC system was fitted with a 25  $\mu$ l loop and an autosampler for sample processing. System control and post-run analysis were performed with Chromeleon® software (version 6.80, Dionex). The quantification limit for all analyses was 50  $\mu$ g l<sup>-1</sup> with an uncertainty of 60 % according to the norm NF T 90-210. Cation concentrations (Ca, K, Mg, Na, Al, As, Sr, Fe) were determined using Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) using a Varian 720 ES model. All samples were analysed in quadruplicate and run together with certified reference materials (stream sediments NCSDS 36006 and NCSDS 36004).

### 2.2.3 X-ray diffraction (XRD)

Collected COx sample were analysed using a Bruker D8 Advance diffractometer equipped with a LynxEye detector was used. X-radiation ( $\lambda = 1.78897 \text{ \AA}$ ) was emitted by a source of cobalt 35 KV and 45 mA. The analysis time was about 1:30 to a  $2\theta$  angle ranging from 3 ° to 64 ° with a step of 0.035 ° and an acquisition time by no 3s. This analysis allowed to obtain semi-quantitative data and to assess the relative abundance of crystallized mineralogical phases in the samples.

### 2.2.4 Plant antioxidant compound analyses

Antioxidant compound extraction from leaves, roots, flowers and COx samples was achieved by solid phase microextraction (SPME fiber assembly 100  $\mu$ m, ref 57300-U, Sigma-aldrich) by Lexva-analytique (Saint-Beauzire, France). SPME fiber was introduced into the headspace of vials with leaf, root or flower samples. After 20 min of extraction, the SPME fiber was inserted into a GC injection port for thermal desorption (250°C). The compounds were analysed using an Agilent 7890A gas chromatography (GC) coupled with mass spectrometry (MS) (Agilent 5975C). Identification of the peaks from mass spectrum analyses was performed by referring to McLafferty & Stauffer, (1989); Adams, (2007).

### 2.2.5 Microbiological analyses

Mycorrhizal colonization of roots was determined on fresh subsamples using Trypan blue staining (Koske & Gemma, 1989) and counting according to Trouvelot et al. (1986). DNA extraction from COx (0.5 g freshly ground sample) was performed using FastDNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) extraction kit according to the method described by the supplier, with an elution volume of 80  $\mu$ l to 0.5 g of COx. Bacterial and fungal abundances were estimated using 16S and 18S rRNA gene quantification by Real-Time PCR (Q-PCR) with

eubacterial 968F and 1401R universal primers (Felske et al., 1998), and fungal Fung5F and FF390R universal primers (Lueders et al., 2004). Amplification reactions (20  $\mu$ l final volume) were performed using 10  $\mu$ l of iQ SYBR green SuperMix (Bio-Rad), 0.8  $\mu$ l of each primer (10  $\mu$ M), 0.4  $\mu$ l of 3 % BSA (bovine serum albumin) solution, 0.2  $\mu$ l of DMSO (dimethyl sulfoxide), 0.08  $\mu$ l of T4 bacteriophage gene 32 product (MP Biomedicals, France) and 1  $\mu$ l of three-fold diluted DNA, corresponding to 3.1 to 7.8 ng. The PCR conditions were as follows: 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 seconds, 54°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and a final extension step at 72°C for 7 min. 16S rDNA gene copy number was estimated using SYBR Green (iQ SYBR Green SuperMix, Biorad): from 51°C to 95°C, increased 0.5°C every 10 seconds, fluorescence acquisition (Cébron et al. 2008; Thion et al. 2012). Quantification was performed using a CFX96 Real-Time PCR detection system (Bio-Rad). Quantitative calibration was performed by using standard plasmid dilution series ( $10^8$  to  $10^1$  copies  $\mu$ l<sup>-1</sup>) (Cébron et al. 2008 and Thion et al., 2012). Results were expressed as 16S and 18S rDNA gene copy number g<sup>-1</sup>.

#### 2.2.6 Data analyses

The cumulated quantity of rainwater on the slope of the COx heap was calculated according to the following equation: Quantity of rainwater (l) = rainfall (m) x area of the heap slope (m<sup>2</sup>) x 1000. The cumulated quantity of leached element on heap slope was calculated by the following equation: Quantity of leached element (g) = quantity of runoff water between two samplings (l) x element concentration of runoff water (mg.l<sup>-1</sup>) / 1000.

After normality test with Shapiro-Wilk's test, comparisons between treatments for each parameter were made using one-way or two-way ANOVA followed by Fisher's LSD test to compare differences between multiple groups. XLStat Software (version 2012.6.01) was used for data analyses.

### 2.3 Results

After one year the lavandins were well established on the COx heap (about 80 % survival of lavandins from flat area of COx heap). For the sampled lavandin plants, root-shoot ratio was 0.42 ( $\pm$ 0.10), with 64.2 g ( $\pm$ 20.4) and 25.5 g ( $\pm$ 2.1) of shoot and root biomass respectively. Within one year, the cumulated rainfall was around 1100 mm (Figure 44). Daily rainfall was 3 mm on average with a maximum of 32 mm and a minimum of 0 mm. We observed a significant decrease of fine clay particles from the COx in the runoff water collecting device of the planted heap (i.e. 100 times less) compared to the unplanted one (data not shown). The

concentration of anions and cations (data not shown) was very low in the rainfall water, but was much higher in the runoff water from the heap.

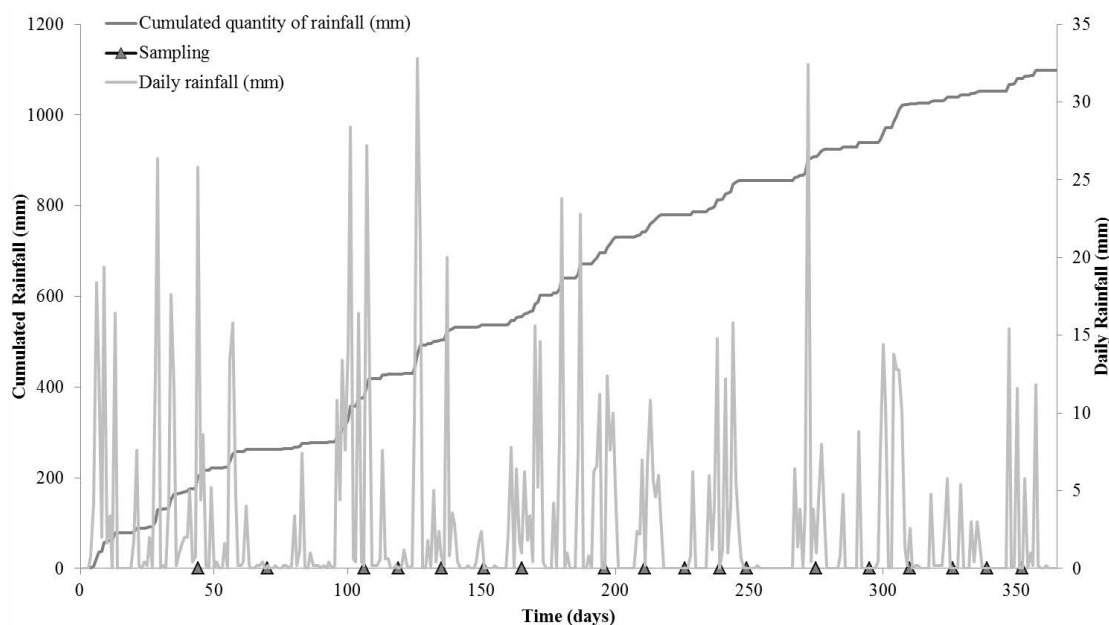


Figure 44: Rainfall at Bure from July 1st 2014 to June 30th 2015 with daily rainfall (mm), (gray peaks), cumulated quantity of rainfall (mm) (dark line) and sampling dates (dark triangles).

The cumulated quantities of arsenic, strontium (Figure 45a), nitrate (Figure 45b), sulphate and magnesium (Figure 45d) leached from the COx heap were lower for the planted than the unplanted part of the COx heap. However, the cumulated quantities of leached sodium (Figure 45a), chloride (Figure 45b) and calcium (Figure 45c) were higher for the planted than the unplanted heap part. For potassium, the cumulated quantity of element leached was equivalent for the planted and unplanted heap parts.

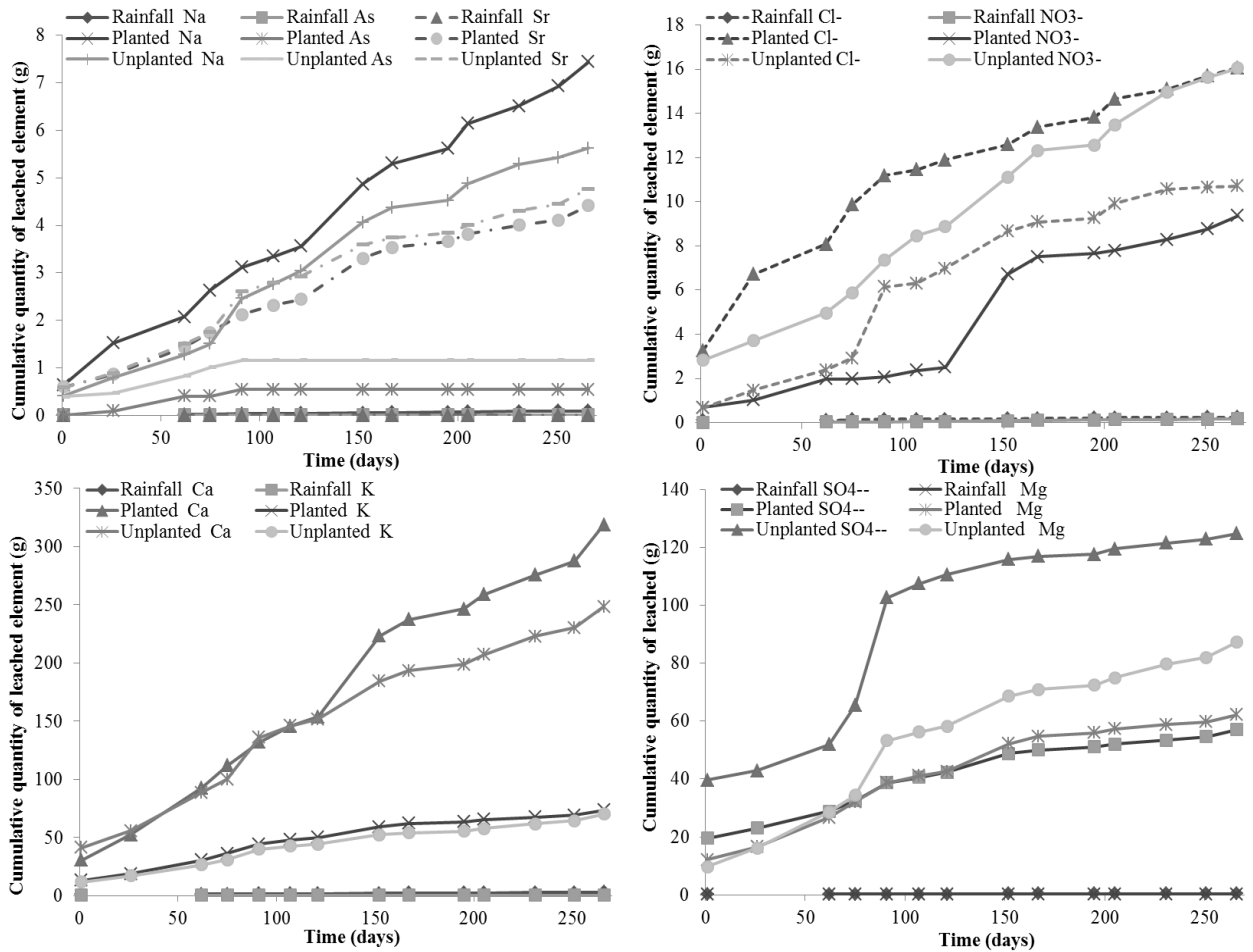


Figure 45: Quantities of leached cations and anions from planted (lavandin) and unplanted COx heap and in rainwater for 351 days. a) sodium (Na), arsenic (As), and strontium (Sr); b) chloride (Cl<sup>-</sup>) and nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); c) calcium (Ca), potassium (K); d) magnesium (Mg), sulphate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>).

The concentration of water extractable chloride from the COx sampled on the heap after one year was significantly higher for planted than unplanted COx (Figure 46a). It was significantly lower at 2 cm than at 15 cm depth for the planted COx. The concentration of water extractable nitrate was significantly higher in the surface than in the deep COx sample, especially for the unplanted one. Water extractable concentrations of sulphate, calcium, potassium, magnesium, sodium and strontium were significantly affected by the presence of plants and by the sample depth (Figure 46 d): sulphate, magnesium, sodium, strontium water extractable concentrations were lower in planted than unplanted COx, and lower in surface than in deep samples (Figure 46b,c); calcium and potassium concentrations were lower in planted COx only for the deep COx samples (Figure 46c). XRD spectrum from planted and unplanted COx heap samples did not show significant mineralogical differences (data not shown).

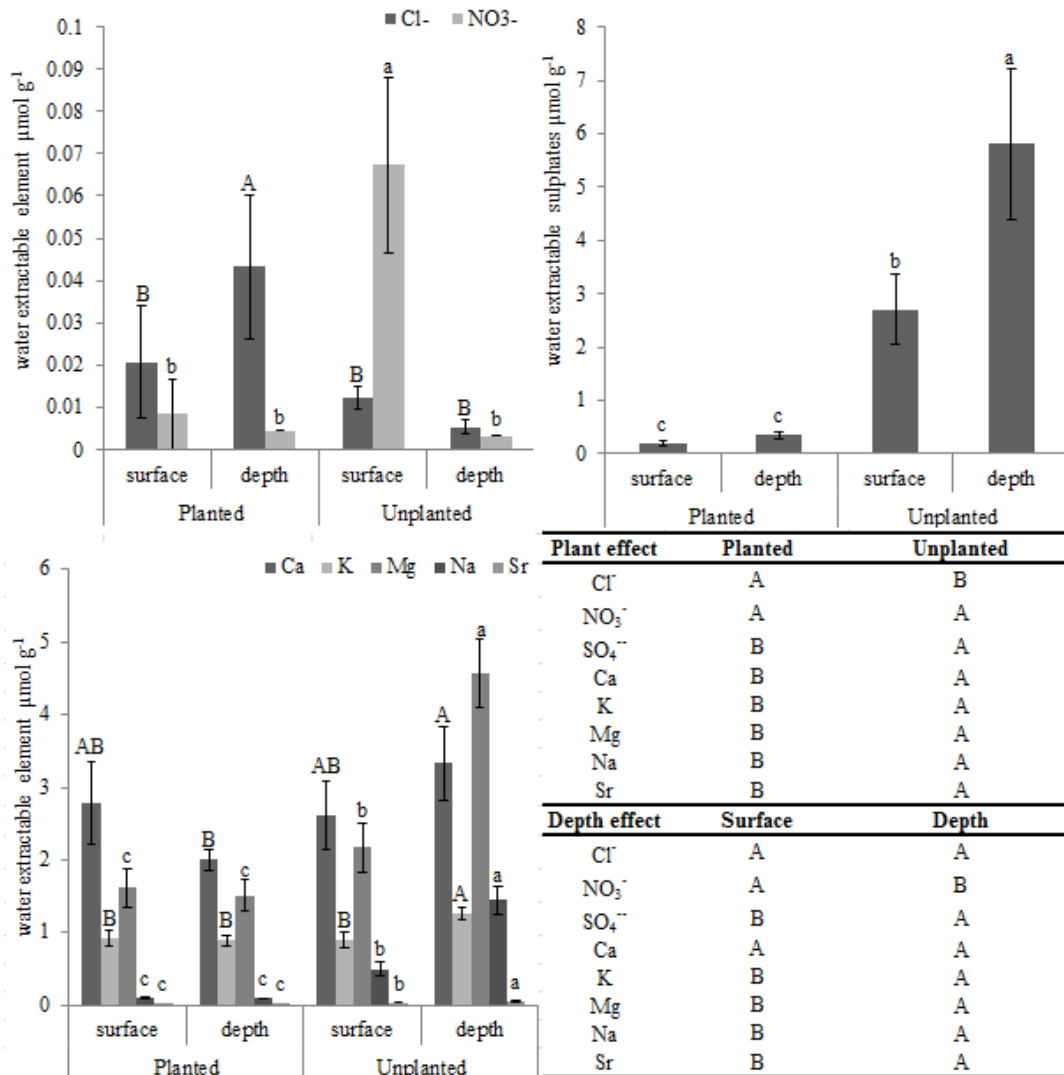
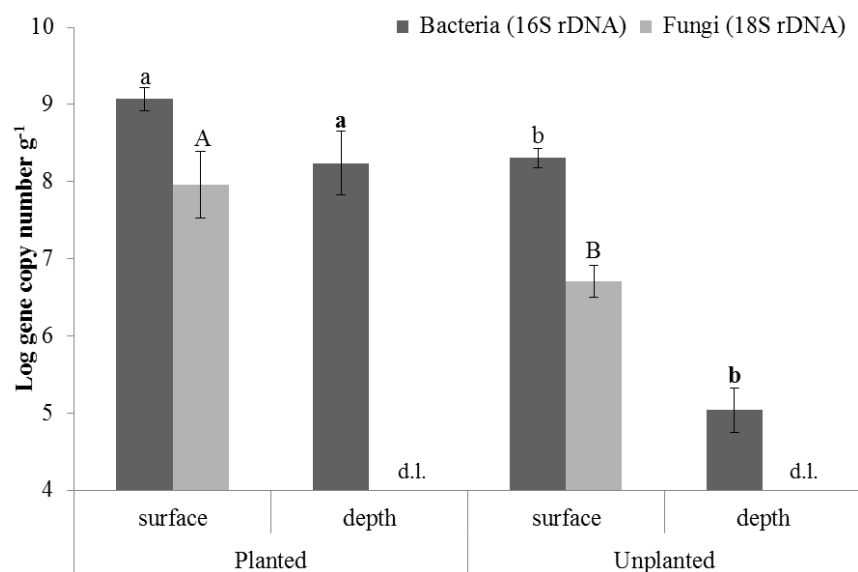


Figure 46: Water extractable concentrations ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$  COx) of a) chloride (Cl<sup>-</sup>), nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); b) sulphate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>); c) calcium (Ca), potassium (K), magnesium (Mg), and sodium (Na) from surface (2 cm) or deep (15 cm depth) planted (lavandin) or unplanted COx at 351 days. Mean  $\pm$  standard deviation (n=4). Results of the two-way ANOVA and post-hoc tests are shown in the table. For each element, mean values with the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

The two-way Anova showed that bacterial gene copy number (16S rDNA) was significantly higher in planted than unplanted COx samples, and in surface than in deep COx. Fungal gene copy number (18S rDNA) was significantly higher in the planted than in the unplanted COx sample and fungal genes were only detected in the surface COx samples. The frequency of roots colonized by mycorrhizal fungi and root colonization intensity were 37 % and 9 % respectively. Arbuscule frequencies in mycorrhizal roots and in the root system were 9 % and 1.5 % respectively.



Plant effect	Planted	Unplanted
16S rDNA	A	B
Depth effect	Surface	Depth
16S rDNA	A	B

Figure 47: Bacterial (16S rDNA) and fungal (18S rDNA) gene abundance (copy number g<sup>-1</sup> COx) at 2 cm (surface) or 15 cm depth (depth) planted (lavandin) or unplanted COx samples at 351 days. Mean ± standard deviation (n=4). Detection limit (d.l.) was 10<sup>4</sup> gene copy number g<sup>-1</sup>. Results of the two-way ANOVA and post-hoc tests are shown in the table below. For each element, mean values with the same letter are not significantly different (p<0.05).

Nine antioxidant compounds could be identified from leaves and flowers of lavandin plants collected on site. Relative percentages of beta-caryophyllene and borneol were higher in flowers compared to the leaves. Relative percentages of alpha-pinene, beta-pinene, camphene, camphor, eucalyptol, limonene and Z-beta-ocimene were higher in leaves than in flowers. Linalool, lavandulyl acetate, linalyl acetate and terpinene-4-ol were only extracted from flowers. Beta-phellandrene, delta-3-carene, gamma-cadinene, para-cymene and sabinene were extracted only from leaves. Borneol and camphor were extracted from leaves, flowers and roots, but the relative percentage of camphor was lower in roots than in leaves and flowers. Coumarin was extracted from leaves and roots, with a higher relative percentage for roots. Fenchol, fenchone and fenchyl formate were extracted only from roots.

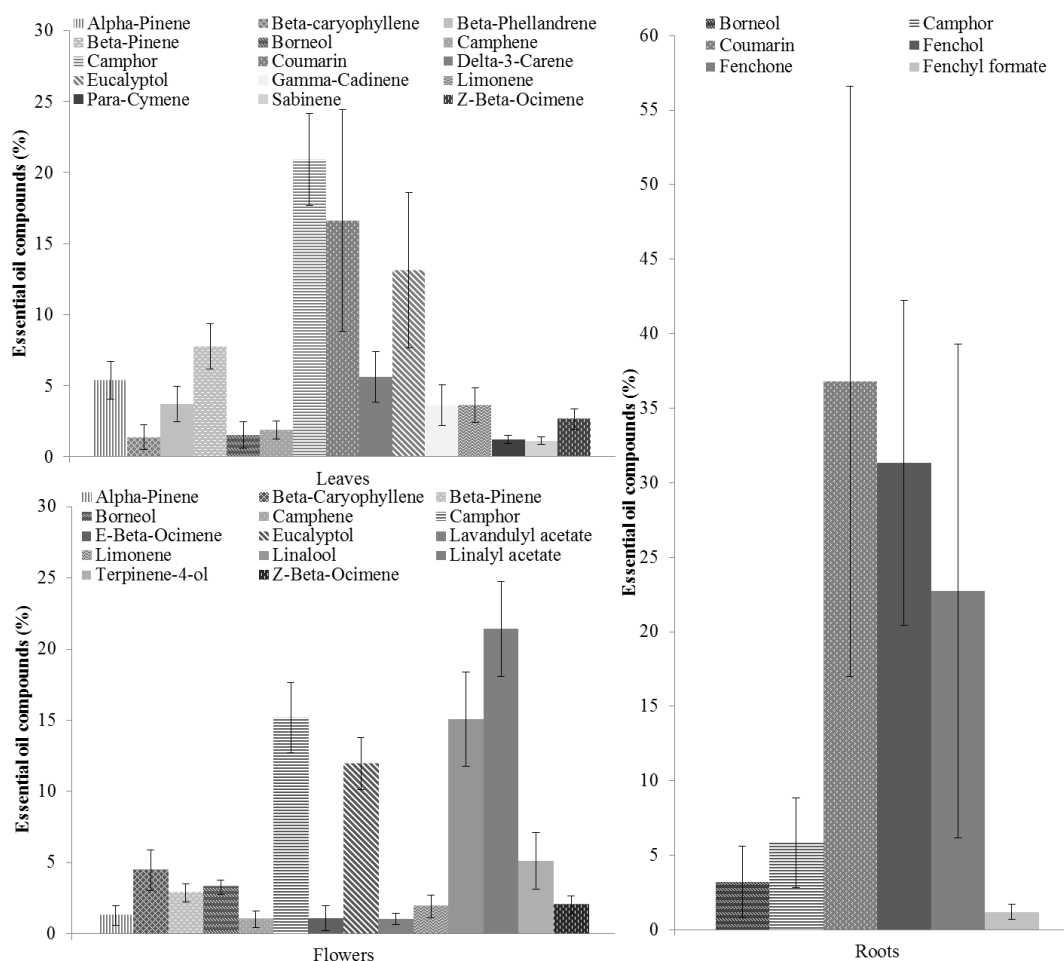


Figure 48: Essential oil compound relative percentage (%) extracted from lavandin leaves (a), roots (b), and flowers (c) at 351 days. Mean  $\pm$  standard deviation ( $n=5$ ), except for coumarin roots ( $n=4$ ). Compounds under 1 % of total composition of essential oil were not shown.

#### 2.4 Discussion

*Lavandula* species may grow despite hydric and nutrient stresses and are adapted to rocky soils (Peñuelas & Munné-Bosch, 2005). These authors suggested that antioxidant compounds have a photoprotective role and enhance plant development in adverse weather conditions. On the COx heap, the lavandin root-shoot ratio was in the range of values reported for three lavender species under controlled conditions (0.38 to 0.50, Ouahmane et al., 2006). The lavandin roots on the COx heap were well colonized by mycorrhizal fungi and arbuscules were present suggesting that the mycorrhizas were active. Mycorrhizal plant roots might prospect a greater volume of soil to acquire nutrients (Subramanian & Charest, 1998) and help the plant to cope with infertile and stressed environments (Plenchette et al., 1983). Indeed, Marulanda et al., (2007) showed a greater water and nutrient uptake for mycorrhizal than non-mycorrhizal roots of *Lavandula latifolia*. The same authors showed that three

months old mycorrhizal *Lavandula dentata* and *Lavandula stoechas* had a root-shoot ratio higher than the non-mycorrhizal corresponding plants. In our experiment, without non-mycorrhizal control plants, we cannot conclude on a potential effect of mycorrhizal colonization on growth and nutrient uptake of lavandin on COx heap. However, mycorrhizal colonization of lavandins growing on the COx heap, that has never been reported previously, indicated that mycorrhizas can be formed in such conditions and be considered as a potential benefit for phytostabilization.

The growth of lavandins on the heap contributed to regulate the physical alteration of COx heap, as shown by the lower quantity of fine clay particles in the runoff collecting device of the planted heap part. Fine clay particles might be trapped on leaf surfaces, and *Lavandula angustifolia* might trap 2 g of clay particles cm<sup>-3</sup> of leaves (Burylo et al., (2012)). In many studies, *Lamiaceae* plants were used to regulate soil erosion and enhance soil physico-chemical parameters (Ouahmane et al., 2006a; b; Durán Zuazo et al., 2008b; Duponnois et al., 2011).

One constraint to revegetation and phytostabilization of the COx heap could be the absence of microbial communities critical for biogeochemical cycling of plant nutrients. Bacteria and fungi from plant rhizosphere contribute to mineral weathering, promote nutrient bioavailability for plant growth, and their diversity might be modified by root exudates (Berthelin et al., 1974; Barker et al., 1998; Cebren et al., 2011). The freshly excavated COx did not contain detectable microbes (Chapter IV-1, Ubersfeld et al., submitted). However, significant numbers of bacterial and fungal genes were found in the 10 year-old COx heap, one year after the set-up of the heap plots, showing that the COx has been colonized by microorganisms. Further, the abundance of bacterial and fungal genes was higher in the planted than the unplanted COx heap. Thus, plant establishment facilitated the microbial colonization of the COx. These results are coherent with our previous results obtained with COx in column experiments, where organic compounds i.e. artificial root exudates increased bacterial and fungal development (Chapter IV-2). The significantly higher bacterial gene copy number (16S rDNA) in the planted COx heap might be induced by organic compounds inflow from roots. Duponnois et al., (2011) characterized lavender as nurse shrubs, and showed that *Lavandula stoechas* enhanced total microbial activity in soil and arbuscular mycorrhizal soil potential (e.g. arbuscular mycorrhizal spores). Plants producing antioxidant compounds such as thymol have antibacterial and antifungal properties (Stahl-Biskup & Sáez, 2002). The comparison with other plants producing no antioxidants and introduced on the COx would be necessary to estimate a relative inhibition or selection of microorganisms by lavandins on the



COx heap. Further, microbial diversity and activity should be considered and not only abundance.

The analysis of essential oil composition indicated the synthesis of antioxidant compounds in leaves, flowers and roots. Similar antioxidant compounds of *Lavandula x intermedia*, Dutch, Giant Hidcote and Super A cultivars were identified by Kara & Baydar (2013). The relative proportion (%) of the compounds in the essential oil were much higher compared to those presented by Bombarda et al., (2008), except for linalool and linalyl acetate which were lower in *Lavandula x intermedia* Grosso oils. However, sampling time of flowers, soil mineralogy and climate might influence oil composition and synthesis (Angioni et al., 2006). Our results showed an important relative synthesis of aromatic compounds or cyclic monoterpenes from roots as coumarin, fenchol or fenchone. If *Lavandula x intermedia* Grosso cultivar oil is well known (Renaud et al., 2001; Kara & Baydar, 2013), few results showed aromatic compounds or triterpenes from the roots of *Lavandula stoechas* (Topcu et al., 2001).

No antioxidant compounds were detected in COx collected at the surface of the heap. However, COx was not collected deeply in the rhizosphere. No significant evolution of the XRD spectra was observed for the COx sampled in the planted part of the heap, compared to the unplanted heap. The XRD spectra obtained with this heap COx that was excavated 10 years ago were not significantly different either from the one obtained with the freshly excavated COx (Chapitre IV-1), suggesting that no significant weathering of the COx has occurred. However, our results showed significant differences in leached mineral elements between planted and unplanted COx heap (Figure 45). On the one hand, an increase of leached sodium, chloride and calcium from the planted heap was observed. Scholtus et al., (2009) used eluto-frontal chromatography of COx to simulate weathering processes and showed that slightly reactive organic compound such as acetate did not affect COx mineral weathering. However, complexing compounds such EDTA, histidine and oxalate induced mineral weathering mainly of carbonate, calcite and dolomite and also of alumino-silicate from the COx, and leaching of calcium, magnesium, aluminum, and iron. In our study, the increase of leached elements, mainly sodium, calcium, chloride from the planted heap could be due to the release of complex organic compounds from lavandin roots. On the other hand, decreases of leached nitrate, sulphate and magnesium and at a lower extent of arsenic and strontium, from planted heap were noticed. The plant cover decrease water erosion (Elwell & Stocking, 1976; Bochet et al., 1998) and take up nutrients and therefore might decrease the leaching of mineral nutrient elements from the COx heap. Indeed, the cumulated quantity of leached element from the heap slope did not take into account water and mineral element

uptake by plants. Organic compounds from root exudates, such as amino acids, adsorbed on clay surfaces, might decrease repulsion between clay particles, reactive surfaces of minerals and enhance clay particle aggregation (Henrichs & Sugai, 1993; Tian et al., 2015), possibly decreasing carriage of fine clay particles from heap and mineral weathering. A reduced sulphate leaching rate was observed in a column experiment with thymol addition at low concentration (Ubersfeld et al., submitted, Chapter IV-1). Sulphate leaching percentage was also decreased with higher concentration of thymol combined with bacterial inoculation and addition of artificial exudates (Chapter IV-2), suggesting a possible contribution of antioxidant compounds to the reduced leaching of sulphate. Moreover, our results on water extractable elements from COx sampled at 2 or 15 cm depth in the heap confirmed the plant effect with a decrease of water extractable mineral elements such as calcium, magnesium, potassium, nitrate and sulfate concentrations in planted COx. Only the upper 15 cm of the heap were investigated, since the weathering of the COx starts on the surface with the formation of a white crust, and plant roots mainly colonize the upper layer. However, a longer monitoring period and at deeper layer of the planted COx heap could be performed to study evolution process.

## 2.5 Conclusion

*Lavandula x intermedia* “grosso” cultivar grew on the COx heap and produced different antioxidant compounds. This nurse plant from dry and nutrient poor ecosystems enhanced bacterial development was highly colonized by mycorrhizal fungi and decreased sulphate, calcium, magnesium, sodium leaching and erosion of COx in comparison to the unplanted heap part. This could be due to the plant cover effect, and possibly to an additional effect of the antioxidant compounds (Ubersfeld et al., submitted, Chapter IV-1)). Although COx heap evolution at a greater depth and over a longer timescale could be investigated to appreciate physico-chemical and microbiological COx heap evolution, such in situ results are promising for the use of lavandins for the phytostabilization of the COx heap.

## Chapitre VI. Discussion générale – Perspectives et conclusions

---



Les objectifs principaux de ce travail de recherche étaient de déterminer l'influence de molécules antioxydantes d'origine végétale et de la rhizosphère des plantes sur les processus d'altération physico-chimique et microbiologique de l'argilite du Callovo-Oxfordien (COx). Dans le cadre du stockage géologique profond de déchets nucléaires, l'argilite excavée sera entreposée en surface et soumise rapidement à l'influence des conditions climatiques et aux interactions abiotiques-biotiques complexes entre plantes, minéraux et microorganismes (Figure 49). Une série d'hypothèses sur les interactions potentielles entre les composés d'origine végétale (i.e. composés antioxydants, exsudats racinaires), les bactéries du sol rhizosphérique ou non, et les minéraux ont ainsi été formulées au début de ce travail (Chapitre I). L'hypothèse fondatrice de ce travail était que l'apport de molécules antioxydantes (thymol, carvacrol, linalol, ...) par les plantes contribuerait directement à limiter les processus d'altération des minéraux constitutifs de l'argilite et à stabiliser l'évolution physico-chimique des vers. Les modes d'action envisagés reposaient sur l'adsorption de ces molécules sur les éléments argileux, carbonatés, ferrifères ou organiques du COx. Il était aussi envisagé que ces molécules, au-delà d'une action directe sur l'altération minérale, agiraient indirectement *via* la modification de la microflore ou des activités microbiennes, voire leur inhibition. De façon similaire, l'hypothèse que les exsudats produits par les racines des plantes favoriseraient le développement microbiologique dans l'argilite et stimuleraient, en revanche, les processus d'altération des minéraux, a été posée. Ainsi, les points qui ont été abordés dans ce travail sont (i) l'effet inhibiteur des molécules antioxydantes produites par les plantes sur l'altération et la transformation des minéraux, surtout sulfurés (*e.g.* pyrite), et/ou le développement microbien, (ii) l'effet positif des exsudats sur l'activité microbienne et sur les cinétiques de lixiviation et d'altération des minéraux, et (iii) la synergie ou l'antagonisme des effets « antioxydants » et « exsudats » dans l'altération de l'argilite.

Pour aborder ces questionnements, l'évolution des propriétés physico-chimiques et microbiologiques de l'argilite ainsi que les cinétiques de lixiviation des éléments minéraux ont été étudiées dans des dispositifs expérimentaux *ex situ* ou *in situ* et de complexité croissante. En conditions de laboratoire (*ex situ*) il s'agissait, d'identifier précisément les différents processus biotiques ou abiotiques gouvernant la lixiviation des éléments minéraux et participant à l'altération ou la stabilisation de l'argilite. Deux expériences en microcosmes en conditions contrôlées, ont ainsi permis (i) d'étudier les interactions abiotiques entre les composés antioxydants d'origine végétale choisis et l'argilite, puis (ii) de simuler la présence de plante, par l'ajout d'exsudats et de composés antioxydants et apprécier les interactions

avec le compartiment microbien, par une inoculation du COx. Conjointement aux études en microcosmes, des expériences « pilotes » ont été réalisées très tôt *in situ* (sur les vers), afin de tester en conditions réelles la capacité des plantes choisies à produire des composés antioxydants et à stabiliser l'altération de l'argilite. La première expérience a permis de confirmer, sur un cycle de végétation, la bonne adaptation, l'implantation et le développement de la lavande et du lavandin sur l'argilite, un substrat *a priori* peu fertile. La deuxième expérience, avec le lavandin, a permis d'apprécier l'évolution physico-chimique et microbiologique du COx sur les parcelles de versées plantées et non plantées. Grâce à ces expériences pilotes, les résultats obtenus en microcosmes ont pu être validés et l'évolution de l'argilite ainsi que de son couvert végétal ont pu être suivis régulièrement pendant plusieurs mois et années.

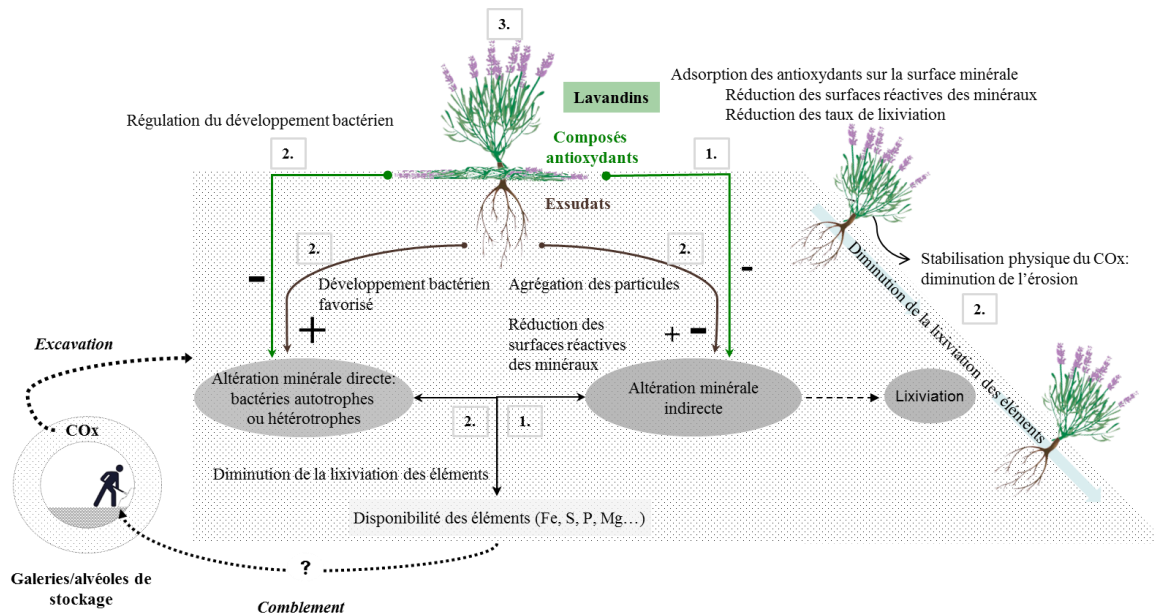


Figure 49 : Représentation des interactions entre le lavandin, les microorganismes et le COx, avec + : activation et - : inhibition ; les processus d'activation ou d'inhibition dominants observés sont indiqués par des symboles de tailles supérieures. Les chiffres encadrés correspondent aux parties abordées dans cette discussion générale

## 1 Effet des composés antioxydants sur l'altération de l'argilite

L'hypothèse testée en microcosmes était que les composés terpéniques antioxydants (thymol, carvacrol et linalol) pouvaient modifier les processus d'altération physico-chimiques du COx frais, et donc les quantités et les cinétiques des éléments lixiviés au cours du temps (Chapitre III). L'effet « antioxydant » escompté devait surtout être observé sur l'oxydation électrochimique des sulfures contenus dans l'argilite, donc sur les cinétiques et les taux ou rendement de lixiviation des sulfates. Dans la première expérience « quasi-abiotique » avec le

COx frais, la densité bactérienne extrêmement faible, et l'absence de sources de carbone facilement métabolisables, nous a permis d'attribuer les lixiviations des éléments minéraux mesurées à des processus essentiellement abiotiques (Chapitre IV-1). Or, seule une diminution significative des vitesses de lixiviation des sulfates a pu être observée en présence de thymol à 2 mg.l<sup>-1</sup>. Aucun effet inhibiteur significatif sur les cinétiques de lixiviation n'a pu être constaté en présence des autres terpénoïdes (carvacrol et linalol), quelles que soient les concentrations utilisées de 0 à 80 mg.l<sup>-1</sup>. Les vitesses sont proches de celles de l'échantillon de COx témoin, lixivié à l'eau. Contrairement à l'hypothèse soutenue, l'accroissement de la concentration en thymol facilite la lixiviation des sulfates. Les vitesses de lixiviation augmentent rapidement pour dépasser d'environ 20% celle du témoin aux plus fortes concentrations en thymol. Néanmoins, les quantités totales de sulfates lixiviées n'augmentent pas pour autant avec la concentration en thymol et auraient même un comportement inverse. Le thymol agit donc à la fois positivement sur la vitesse de lixiviation des sulfates et négativement sur les taux de lixiviation : aux faibles concentrations, plus de sulfates seront lixiviés plus lentement alors qu'aux fortes concentrations ce sera l'inverse. Dans ce cas, on ne peut pas vraiment parler d'effet inhibiteur ou activateur du thymol. Cet effet en « demi-teinte » du thymol a été confirmé dans la deuxième série d'expérience où un apport supplémentaire de sulfures (pyrite finement broyée) a été réalisé. De même, bien que les vitesses de lixiviation restent comparables à celles des témoins, à dose équivalente, l'ajout croissant de linalol diminue le taux de lixiviation des sulfates par rapport au thymol. Plus surprenant, le carvacrol, un isomère du thymol, n'a aucun effet sur la lixiviation des sulfates, pas plus en terme cinétique que de rendement.

Néanmoins, à l'exception du carvacrol, l'ajout de molécules antioxydantes surtout aux faibles doses semble plutôt favoriser la lixiviation des sulfates et accroître le rendement d'altération. Ces résultats contraires à l'hypothèse sont, en revanche, intéressants et indiquent que l'effet des molécules « antioxydantes » employés ne peut pas être interprété dans le seul cadre d'une passivation électrochimique de la réactivité des sulfures.

Au cours de ce travail, plusieurs explications physico-chimiques et biologiques, ont été avancées pour tenter d'expliquer ces comportements contradictoires et surtout les réponses très variées du COx à l'apport de molécules antioxydantes.

La première hypothèse met en avant les lixiviations immédiates des phases labiles lors des premières phases d'imbibition du COx et de la déstructuration de l'argilite par des processus de gonflement. La mise à l'équilibre de l'argilite avec des solutions à faible force ionique

entraîne une dissolution rapide des sels « marins » emprisonnés lors du dépôt et de la diagénèse de la roche. La lixiviation précoce et intense du sodium en est la preuve. Ceci engendrerait un gonflement des feuillets des phyllosilicates argileux, sous l'action des cations libérés. Les smectites ainsi déstabilisés s'altéreraient alors rapidement du fait de substitutions cationiques.

De plus, les terpénoïdes, tels que le thymol ou le linalol, en s'adsorbant sur la matrice argileuse ou s'intercalant entre les feuillets d'argiles amplifieraient le processus. Cette dégradation physique de l'argilite augmenterait l'accessibilité à d'autres minéraux plus sensibles à l'oxydation par l'air comme les sulfures. Le thymol adsorbé diminuerait alors la réactivité des sulfures à l'oxydation par l'oxygène dissout (Figure 49). La seule véritable preuve de cette action inhibitrice du thymol sur l'oxydation des sulfures est donnée par une diminution sensible et graduelle des vitesses de lixiviation de l'arsenic lorsqu'on dope le COx avec des particules de pyrites arséniées (Chapitre IV-2). Sinon, le pouvoir tampon des carbonates et la présence d'un fond sulfaté important (30  $\mu\text{M}$ ) masquent les réponses des autres traceurs d'altération, *i.e.* fer et soufre.

Cependant, les différences des taux de lixiviation observées pour le linalol et le thymol pourraient aussi s'expliquer par les variations au niveau de leurs sous-unités d'isoprène (Guitton, 2010). Le linalol est un monoterpène acyclique simple, tandis que le thymol est un monoterpène monocyclique. Ces différences structurales modifient l'adsorption et la volatilité de ces composés, pouvant diminuer la rétention du linalol par les minéraux du COx. Toutefois, à notre connaissance, les interactions de ces molécules aromatiques, représentatives des huiles essentielles des parties aériennes de plantes, avec des matrices complexes, telles que le COx, ont été peu étudiées. Du fait des propriétés hydrophobes des terpénoïdes aromatiques (thymol, carvacrol), l'ajout artificiel et initial d'antioxydant aurait pu induire une agglomération préférentielle de certaines fines particules minérales et/ou organiques du COx et ainsi modifier les taux et les quantités d'éléments lixiviés (Figure 49). Toutefois, le COx contient seulement 1 à 2 % de pyrite et 1 % de matières organiques. La faible régulation de la lixiviation des éléments minéraux du COx (*i.e.* sulfates, fer, ...) observée dans les expériences au laboratoire pourrait également être due à cette faible quantité d'éléments réactifs sulfurés pyriteux.

Une autre hypothèse avancée dans ce travail était que l'effet inhibiteur des antioxydants sur les microorganismes devait contribuer à limiter l'altération microbienne du COx. Dans la deuxième expérience avec le COx frais, l'ajout d'un inoculum microbien et d'exsudats



racinaires a permis d'intégrer l'interaction entre les composés antioxydants, les microorganismes et l'argilite. Le principal résultat de cette expérience biotique est le rôle régulateur des antioxydants sur le développement microbien (Figure 49). Cependant, cette diminution de la densité bactérienne n'est pas nécessairement accompagnée d'une diminution significative des cinétiques de lixiviations et des quantités d'éléments lixiviés. Hormis quelques résultats notables sur l'arsenic ou l'aluminium, les résultats obtenus ne mettent pas en évidence un effet des antioxydants sur les processus d'altération minérale du COx impliquant l'activité des microorganismes. Dans les gammes de concentrations employées (*i.e.* 2 ; 40 et 80 mg.l<sup>-1</sup> et 0,2 ; 2 et 20 mg.l<sup>-1</sup>), l'effet du thymol a été validé aux doses les plus faibles (2 mg.l<sup>-1</sup>). Son effet bactériostatique sur la microflore n'a pas été testé aux concentrations supérieures à 20 mg.l<sup>-1</sup>.

## **2 Impact de la végétalisation sur les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques du COx**

La deuxième expérimentation menée en microcosmes avait pour objectif de refléter la présence d'une plante produisant des composés antioxydants, via l'ajout de thymol ou de linalol et d'exsudats racinaires synthétiques. L'ajout supplémentaire d'un inoculum extrait d'un sol du CMHM avait pour but de simuler la présence d'une microflore active et installée au sein du COx. Cette combinaison microorganismes/exsudats/antioxydants était aussi un moyen d'estimer les prédominances relatives de ces différents agents sur les lixiviations des éléments. Nous avons surtout constaté que les composés terpéniques, et plus particulièrement le thymol, réduisaient le développement bactérien, tandis que l'apport d'exsudats synthétiques stimulait le développement bactérien et leur métabolisme. De nombreux métabolites secondaires, principalement des acides carboxyliques, étaient alors libérés par les microorganismes allochtones, via la dégradation des sucres apportés par les exsudats. La matrice carbonatée très réactive de l'argilite, composée principalement de calcite, devrait donc s'altérer par voie acide lors des cycles d'imbibition et de dessiccation.

Toutefois, bien que les quantités de métabolites produits de l'ordre 1<sup>-10</sup> mM fussent suffisantes pour acidifier le COx et altérer les principaux constituants minéraux, (alumino-silicates et carbonates), leur action n'est pas détectable et sensible. Ainsi, l'apport d'exsudats diminuait les quantités d'éléments lixiviés comme le chlore et surtout de nutriments essentiels comme le potassium, le calcium ou le fer. Plus logiquement, l'apport simultané d'antioxydants et d'exsudats réduisait la croissance bactérienne, la quantité d'acides organiques produits et par conséquent les quantités d'éléments lixiviés. Ces résultats obtenus

sur les éléments lixiviés ne nous permettent pas de valider l'hypothèse initiale d'une augmentation de l'altération des minéraux en présence d'exsudats racinaires. Toutefois, cette conclusion doit être modérée.

Comme nous avons pu le constater lors des étapes de filtration sous vide, l'apport conjoint d'exsudats riches en sucres et de bactéries favorise la production de polymères qui colmatent la porosité du COx. Ces films organiques ou biofilms limiteraient le transport des composés réactifs vers les surfaces minérales. De même, certains acides aminés, chargés négativement, issus des exsudats racinaires pourraient s'insérer entre les feuillets d'argiles, et/ou s'adsorber aux surfaces minérales et favoriser l'agrégation des particules minérales (Henrichs & Sugai, 1993; Tian et al., 2015). Les interactions entre ces différents composés organiques et les éléments en solution pourraient aussi contribuer à la formation de complexes organo-minéraux, de minéraux secondaires, tels que le gypse ou les oxy-hydroxydes de fer et modifier la réactivité des ions en solution. Tous ces processus contribueraient ainsi à rendre les surfaces minérales moins sensibles aux agents d'altération (oxygène et acides) et à piéger en grande partie les éléments minéraux lixiviés. Cette hypothèse est confirmée par les extractions menées sur des échantillons de COx prélevés *in situ* sur les verses plantées et non plantées (Chapitre V-1). Les extractions à l'eau d'échantillons de COx des deux essais *in situ* montrent que des éléments comme le chlore sont retenus dans l'argilite dans les zones plantées, mais ce n'est pas le cas pour le calcium et le strontium dont les teneurs extractibles sont plus faibles dans la verse plantée. Ces éléments proviennent principalement de l'altération des fractions carbonatées de l'argilite par les protons et les métabolites acides libérés. Aucun effet significatif des plantes n'a été observé sur des éléments métalliques majeurs (Al, Fe) ou des anions comme les sulfates, qui indiquerait l'altération des minéraux silicatés ou pyriteux constitutifs de l'argilite. Mais la diminution des teneurs extractibles en sulfates dans les deux essais plantés par rapport aux non plantés pourrait indiquer l'altération de minéraux pyriteux constitutifs de l'argilite.

Dans les essais *in situ*, une diminution de la lixiviation des éléments en présence de lavandins, et, plus particulièrement en profondeur, a été observée, confirmant ainsi ce qui avait été observé dans les colonnes au laboratoire. Les composés organiques racinaires induiraient, comme dans les expériences au laboratoire, des interactions avec les surfaces minérales du COx, et pourraient former des composés organo-minéraux et favoriser l'agglomération des fines particules de matrice argileuse.

Les résultats obtenus en microcosmes et *in situ* sont cohérents. L'activité microbienne, favorisée par la présence de plantes, contribue aux processus d'altération minérale et de complexation et à réduire l'intensité des flux des minéraux lessivés par les eaux météoritiques. La relative atténuation de la lixiviation ne serait due qu'au piégeage des éléments minéraux dans les agrégats bio-organo-minéraux ou les biofilms formés. Cependant, il n'existe pas de preuve directe de l'altération des minéraux sous l'effet d'un couvert végétal. Comme pour les essais en microcosmes, aucune évolution minéralogique significative n'a été observée sur les échantillons de COx issus de la verse plantée ou témoin. Toutefois, on ne peut exclure, qu'*in situ* en présence de lavandins, l'atténuation apparente de la lixiviation des éléments observée soit aussi due à l'absorption racinaire nécessaire au maintien du métabolisme de la plante.

L'analyse et les mesures semi-quantitatives par SPME des composés volatils foliaires et racinaires sur les plants de lavandin ont été réalisées au bout d'un an de plantation. De fortes quantités d'antioxydants floraux (camphre, eucalyptol, linalol et acétate de linalyl), foliaires (camphre, coumarine, eucalyptol) et racinaires (coumarine, fenchol, fenchone) ont été détectées. Les composés aromatiques détectés et analysés par spectrométrie de masse correspondent à ceux généralement identifiés chez les lavandins. (Kara & Baydar, 2013). Les profils qualitatifs varient en fonction des jours de prélèvements et de l'échantillon. Sur les plantations *in situ*, on observe une surproduction de certains composés antioxydants comme les coumarines dans les feuilles et les racines, lors des cultures sur COx. On peut y voir une réponse physiologique de la plante à un stress oxydant généré par le COx altéré. Toutefois, la limite de détection étant très haute comparée aux teneurs retrouvées dans les parties aériennes et racines, aucun composé antioxydant n'a été observé dans le COx prélevé en surface *in situ* sous les parties aériennes des lavandins. Si l'apport par les résidus foliaires (feuilles) n'est pas significatif celui par les racines l'est peut-être. Cependant, aucun prélèvement de COx rhizosphérique n'a été réalisé et analysé pour apprécier le transfert des composés antioxydants foliaires et racinaires vers les horizons profonds du COx.

### 3 Choix des plantes pour la phytostabilisation des verses de COx

Ce travail a mis en évidence le rôle primordial des plantations afin de limiter l'altération physico-chimique (i.e. lixiviation des éléments minéraux) et favoriser l'installation progressive d'interactions plante-microorganisme-argilite. Afin de végétaliser les verses du COx, un ensemble de plantes d'intérêt ont été identifiées en considérant les contraintes

climatiques et édaphiques, la rusticité et la synthèse de composés antioxydants comme paramètres de recherche. Les essais préliminaires de germination sur COx frais et âgé, ont montré que les Lamiacées et notamment la lavande étaient les mieux adaptées. Le développement racinaire significatif des lavandes au sein du COx, sans évitement des zones enrichies en sulfures a pu être observé en microcosmes et *in situ*.

Sur les verses d'argilite, les plantes sélectionnées, la lavande, *Lavandula angustifolia vera*, et le lavandin, *Lavandula x intermedia* « *grosso* » se sont implantées durablement sans apport de substances fertilisantes. Après deux ans, les plantes sont toujours vivaces et fleurissent chaque année. L'implantation dense de plants de lavandins sur les versants et les tables de la verse stabilise chimiquement et physiquement l'évolution du COx, par une réduction significative de la lixiviation des éléments essentiels (nutriment, oligo-éléments), et de l'érosion, en diminuant d'un facteur 100 la quantité de COx charriée en bas de pente de la verse plantée par rapport à la verse non plantée. Scholtus, (2003) a démontré que la plante peut favoriser les processus initiaux d'altération minérale en diminuant la teneur en eau du substrat, favorisant ainsi la saturation en sels du substrat. Cependant, lors du suivi de la verse végétalisée, un retard dans la lixiviation de certains éléments a été observé sur les pentes des verses.

Grâce à sa forte rusticité, le lavandin a pu se développer sur un substrat peu fertile comme le COx et faciliter l'installation d'une microflore active. L'argilite altérée subvient aux besoins nutritionnels du lavandin. Les essais de longue durée avec le lavandin se poursuivent actuellement et confirment la vivacité des plantes après 2 ½ ans. Par ailleurs, les analyses ont montré une mycorhization forte des racines des lavandins sur le COx ainsi qu'une augmentation de la densité bactérienne par rapport au COx non planté.

Dans notre étude, la phytostabilisation a été envisagée pour la régulation de l'érosion des sols et l'apport de matières organiques (Elwell & Stocking, 1976; Bochet et al., 1998). Les plantes aromatiques, dont les *Lamiaceae*, ont été sélectionnées, car elles participent à la diminution de l'érosion des sols et améliorent leurs qualités physico-chimiques (Durán Zuazo et al., 2008)

Nous avons pu vérifier *in situ* que le lavandin remplissait parfaitement ces rôles. D'autres études confirment l'utilisation de *Lamiaceae*, et plus particulièrement de lavandes afin de végétaliser et dynamiser les écosystèmes subissant des activités anthropiques (Ouahmane et al., 2006a; b; Duponnois et al., 2011).

D'autres plantes pérennes et modèles de laboratoire, souvent utilisées pour la végétalisation des sols pollués auraient pu être utilisées, telles que le ray-grass ou la luzerne. Malgré un faible taux de germination ou de survie de ces plantes sur le COx (Chapitre III), les développements des parties aériennes, synthétisant des composés antioxydants à faibles

concentrations (e.g. linalol) (Blackmer et al., 2004) et racinaires rapides auraient pu prospecter et coloniser le COx rapidement et induire une phytostabilisation physique rapide. Les travaux de Scholtus (2003) avaient d'ailleurs montré que la végétalisation d'un analogue du COx était possible par des plantes d'autres familles, telles que la fétuque de la famille des Poaceae et le lotier, de la famille des Fabaceae. Cependant, ces essais n'avaient pas été réalisés *in situ* et sur le COx.

#### 4 Perspectives

Pour compléter ce travail, l'évolution minéralogique du COx suite aux lixiviations avec des solutions d'antioxydants, d'exsudats racinaires, ou suite à la mise en place de verses végétalisées ou non *in situ*, mériterait d'être étudiée. Toutefois, les taux de lixiviation assez faibles des principaux métaux (quelques ‰) ne sont pas très favorables pour des caractérisations minéralogiques globales, comme nous l'ont montré les analyses DRX ou IR réalisées dans ce travail. Ces approches devraient avoir recours à des mesures locales par des micro-spectrométries Raman, en se focalisant sur l'étude des phases minérales secondaires ou les complexes organiques formés à la surface des particules altérées. Une étude microscopique détaillée des agrégats bio-organo-minéraux ou des biofilms serait nécessaire.

Des expériences complémentaires sur les cinétiques d'adsorption et de désorption des composés antioxydants (terpénoides) sur les minéraux du COx, devraient être réalisées avec des techniques d'analyses sensibles de ces composés polaires en phases liquides et solides. La gamme de concentrations testées devrait être étendue pour mieux identifier les interactions physico-chimiques et évaluer l'effet dose notamment sur les microorganismes et leur activité. Les concentrations en antioxydants ont, en effet, été choisies *a priori* en fonction des données de la littérature portant sur la régulation des processus d'oxydo-réduction des minéraux sulfurés, tels que la pyrite.

L'analyse des huiles essentielles réalisée tardivement à partir des lavandins plantés sur la verse, aurait pu aussi servir à orienter le choix des antioxydants modèle pour ce travail. Cependant, les essais sur verses et en microcosmes ont été concomitants, et à l'exception du linalol, thymol et carvacrol n'ont pas été détectés dans les feuilles et racines des lavandins plantés. Il était difficile d'envisager dans un même travail de choisir à la fois, les plantes et les antioxydants à partir d'essais « pilotes », nécessairement longs et complexes. Néanmoins, les temps d'expérimentation *in situ* mériteraient d'être allongés afin de caractériser la composition et la cinétique d'évolution dans le temps des exsudats racinaires et des composés antioxydants de lavandins (sucres, acides aminés et organiques, composés à noyaux

aromatiques,...) en fonction des cycles de végétation. Il resterait à démontrer si les composés antioxydants produits par le lavandin *in situ* affectent les communautés microbiennes

Les durées des expérimentations « pilotes » *in situ*, de l'ordre de l'année, ont été établies afin que les plantes puissent effectuer une période de végétalisation complète, mais la colonisation racinaire n'était pas encore très développée. Lors des études *in situ*, nous n'avons pu apprécier que l'impact du couvert végétal sur le COx âgé de 10 ans, par comparaison avec le COx non planté, et quantifier les communautés bactériennes et fongiques aptes à se développer dans le COx. Afin d'affiner l'évolution physico-chimique du COx dans le temps, il serait intéressant d'effectuer des expérimentations *in situ* sur du COx fraîchement excavé densément planté par des lavandins. Ces expérimentations permettraient d'apprécier les évolutions physiques, chimiques et microbiologiques sur des temps longs, de l'ordre de la dizaine d'années, afin de les comparer au COx âgé de la verse actuellement en place. La présence de molécules antioxydantes, en lien avec des litières foliaires ou des débris racinaires, sur le COx, pourrait affecter et sélectionner des communautés microbiennes différentes du COx âgé non planté ou tardivement planté (e.g. verse âgée de 10 ans).

Dans les expériences au laboratoire, le COx frais a été utilisé ou du COx réinoculé par la microflore d'un sol voisinant la verse. Les analyses microbiologiques faites sur le COx frais (NPP, extraction d'ADN et quantification du nombre de copies de l'ADNr 16S) ont montré que celui-ci contient une densité microbienne très faible voire non détectable. Dans la première expérimentation avec le COx frais, sans inoculation, des analyses microbiologiques à la fin de l'expérimentation auraient permis d'identifier et de quantifier une éventuelle faible croissance bactérienne et la relier aux résultats physico-chimiques obtenus. En revanche le COx âgé, *in situ*, présente une densité microbienne beaucoup plus importante. Toutefois, la dynamique de colonisation naturelle du COx fraîchement excavé au cours du temps par la microflore n'a pas pu être évaluée, ni la diversité et l'activité microbienne présente dans le COx *in situ*. Le COx excavé représente ainsi un milieu très particulier dont la colonisation microbienne au cours du temps mériterait d'être suivie.

Dans l'ensemble de cette étude, les communautés bactériennes et fongiques du COx de la verse n'ont pas été étudiées. Il serait donc intéressant de caractériser les communautés bactériennes actives rhizosphériques et non rhizosphériques sur la verse, en fonction de l'âge de celle-ci. Les processus de colonisation bactérienne ainsi que la diversité, l'hétérogénéité des communautés microbiennes, et leur évolution dans le temps, pourraient être analysées, par

des techniques d'empreintes moléculaires telles que la TTGE ou DGGE (thermal temperature gradient electrophoresis) ou par des techniques plus exhaustives telles que le pyroséquençage. Des mesures enzymatiques des principales fonctions métaboliques bactériennes permettraient aussi d'apprécier l'activité potentielle de celles-ci. De plus, l'étude et l'identification des champignons mycorhiziens, encore jamais observés sur le COx, et qui montraient une forte colonisation des racines, mériterait d'être réalisée. L'impact de ces champignons mycorhiziens, observés dans les racines, sur la croissance et la nutrition minérale des lavandins se développant sur l'argilite du COx des verses pourrait être étudiée dans des expériences avec des lavandins inoculés ou non par ces champignons.

## 5 Conclusion générale

Ce travail a mis en exergue que la végétalisation de l'argilite du Callovo-Oxfordien par la lavande et le lavandin est possible *in situ*. Le rôle des exsudats racinaires sur l'évolution physico-chimique et microbiologique du COx s'est avéré prédominant dans les conditions testées par rapport au rôle attendu des antioxydants énoncé au début de ce travail. En laboratoire, le rôle inhibiteur des composés antioxydants foliaires sur la croissance microbienne a été mis en évidence. Cependant, ces molécules ne régulaient pas significativement l'évolution du COx. Les exsudats racinaires ont favorisé le développement microbien, et régulé la lixiviation des éléments issus du COx. *In situ*, le lavandin s'est implanté durablement sur les verses, a permis de stabiliser physiquement et chimiquement l'évolution des verses de COx.

Les expérimentations *in situ* de végétalisation d'une ou de plusieurs espèces végétales mériteraient d'être poursuivies afin de suivre l'évolution écophysiological des plantes et mettre en évidence d'autres composés antioxydants racinaires et/ou foliaires susceptibles d'être utilisés en laboratoire pour étudier leur influence sur l'évolution physico-chimique et microbiologique du COx.





## Bibliographie

- Abbad, A., Belaqqiz, R., Bekkouche, K., & Markouk, M. 2011. Influence of temperature and water potential on laboratory germination of two Moroccan endemic thymes: *Thymus maroccanus* Ball. and *Thymus broussonetii* Boiss. *Afr. J. Agric. Res* **6**, 4740–4745.
- Adams, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. , viii + 804 pp.
- Akgul, Y., Aktas, L.Y., & Anil, H. 2009. Compounds from flowers of *Daucus carota* L. SSP. *carota* and their antioxidant activity. *Chemistry of Natural Compounds* **45**, 889–892.
- Andra. 2005. Evaluation of the feasibility of a geological repository in an argillaceous formation. Dossier 2005 Argile. Report Series. Available at <http://www.andra.fr/international/pages/en/menu21/waste-management/research-and-development/dossier-2005-1636.html>.
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., & Cabras, P. 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 4364–4370.
- Anthony, K.P., Deolu-Sobogun, S.A., & Saleh, M.A. 2012. Comprehensive Assessment of Antioxidant Activity of Essential Oils. *Journal of Food Science* **77**, C839–C843.
- Araujo, I.B., Souza, C. a. M., DeCarvalho, R.R., Kuriyama, S.N., Rodrigues, R.P., Vollmer, R.S., Alves, E.N., & Paumgarten, F.J.R. 1996. Study of the embryofetotoxicity of alpha-Terpinene in the rat. *Food and Chemical Toxicology* **34**, 477–482.
- Arines, J. 1973. Estudio de los factores de crecimiento e inhibidores de *Erica vagans* L.
- Arrebola, M.L., Navarro, M.C., Jiménez, J., & Ocaña, F.A. 1994. Yield and composition of the essential oil of *Thymus serpylloides* subsp. *serpylloides*. *Phytochemistry* **36**, 67–72.
- Avena, M.J., & Koopal, L.K. 1999. Kinetics of Humic Acid Adsorption at Solid-Water Interfaces. *Environmental Science & Technology* **33**, 2739–2744.
- Azar, P.A., Saber-Tehrani, M., Meibodi, Z.A., & Soleimani, M. 2010. Composition of essential oils of leaves, stems, and roots of *thymus kotschyianus* var. *Pseuderiophorus* growing wild in Iran. *Chemistry of Natural Compounds* **46**, 310–312.
- Azcon-Aguilar, C., Palenzuela, J., Roldan, A., Bautista, S., Vallejo, R., & Barea, J.M. 2003. Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. *Applied Soil Ecology* **22**, 29–37.
- Backes, C.A., Pulford, I.D., & Duncan, H.J. 1988. Treatments to combat pyrite oxidation in coal mine spoil. *US Bur. Mines Inform. Circ. IC-9183* **1**, 91–96.
- Bailey, L.K., & Peters, E. 1976. Decomposition of pyrite in acids by pressure leaching and anodization: the case for an electrochemical mechanism. *Canadian Metallurgical Quarterly* **15**, 333–344.
- Baize, D., sol, A. française pour l'étude du, & Girard, M.-C. 2009. Référentiel pédologique 2008. Editions Quae.
- Balland, C., Poszwa, A., Leyval, C., & Mustin, C. 2010. Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **74**, 5478–5493.
- Ballester, A., Vieitez, A., & Vieitez, E. 1982. Allelopathic Potential of *Erica-Vagans*, *Calluna-Vulgaris*, and *Daboecia-Cantabrica*. *Journal of Chemical Ecology* **8**, 851–857.
- Barker, W.W., & Banfield, J.F. 1998. Zones of Chemical and Physical Interaction at Interfaces Between Microbial Communities and Minerals: A Model. *Geomicrobiology Journal* **15**, 223–244.

- Barker, W.W., Welch, S.A., & Banfield, J.F. 1997. Biogeochemical weathering of silicate minerals. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **35**, 391–428.
- Barker, W.W., Welch, S.A., Chu, S., & Banfield, J.F. 1998. Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. *American Mineralogist* **83**, 1551–1563.
- Barrow, N.J. 1970. Comparison of the adsorption of molybdate, sulfate and phosphate by soils. *Soil Science* **109**, 282–288.
- Beaucaire, C., Pitsch, H., Toulhoat, P., Motellier, S., & Louvat, D. 2000. Regional fluid characterisation and modelling of water–rock equilibria in the Boom clay Formation and in the Rupelian aquifer at Mol, Belgium. *Applied Geochemistry* **15**, 667–686.
- Belcourt, O. 2009. La perturbation chimico-minéralogique (Hydratation, état d'oxydation, eau interstitielle) de la zone perturbée excavée et ses relations avec la perturbation texturale et mécanique : application aux argilites des galeries de Bure. Nancy 1.
- Belzile, N., Maki, S., Chen, Y.-W., & Goldsack, D. 1997. Inhibition of pyrite oxidation by surface treatment. *Science of The Total Environment* **196**, 177–186.
- Benzaazoua, M., Bussière, B., & Dagenais, A.M. 2001. Comparison of kinetic tests for sulfide mine tailings. *Tailings and Mine Waste* " " Fort Collins, Colorado, January, 263–272.
- Berthelin, J. 1983. Microbial weathering processes. , 223–262.
- Berthelin, J. 1987. Using Microorganisms to Extract Metals. *Recherche* **18**, 720–725.
- Berthelin, J. 1988. Microbial Weathering Processes in Natural Environments. p. 33–59. In Lerman, A., Meybeck, M. (eds.), *Physical and Chemical Weathering in Geochemical Cycles*. NATO ASI Series. Springer Netherlands.
- Berthelin, J., & Belgy, G. 1979. Processes induced by partial sterilization of soil. **21**, 297–310.
- Berthelin, J., Kogblevi, A., & Dommergues, Y. 1974. Microbial Weathering of a Brown Forest Soil - Influence of Partial Sterilization. *Soil Biology & Biochemistry* **6**, 393–399.
- Berthelin, J., Leyval, C., & Toutain, F. 1994. Biologie des sols. Rôle des organismes dans l'altération et l'humification. *Pédologie* **2**, 143–237.
- Bienfait, H., Bino, R., Vanderblik, A., Duivenvoorden, J., & Fontaine, J. 1983. Characterization of Ferric Reducing Activity in Roots of Fe-Deficient Phaseolus-Vulgaris. *Physiologia Plantarum* **59**, 196–202.
- Blackmer, J.L., Rodriguez-Saona, C., Byers, J.A., Shope, K.L., & Smith, J.P. 2004. Behavioral response of *Lygus hesperus* to conspecifics and headspace volatiles of alfalfa in a Y-tube olfactometer. *Journal of Chemical Ecology* **30**, 1547–1564.
- Blanco Salas, J., Ruiz Tellez, T., Vazquez Pardo, F.M., Perez Alonso, M.J., & Cases Capdevilla, M.A. 2011. Study of the essential oil of three species of thyme in their limit of distribution in Spain. *Acta Botanica Gallica* **158**, 251–262.
- Bloomfield, C., & Coulter, J.K. 1974. Genesis and Management of Acid Sulfate Soils. p. 265–326. In *Advances in Agronomy*. Elsevier.
- Bochet, E., Rubio, J.L., & Poesen, J. 1998. Relative efficiency of three representative matorral species in reducing water erosion at the microscale in a semi-arid climate (Valencia, Spain). *Geomorphology* **23**, 139–150.
- Bochet, E., Rubio, J.L., & Poesen, J. 1999. Modified topsoil islands within patchy Mediterranean vegetation in SE Spain. *Catena* **38**, 23–44.
- Boivin-Jahns, V., Ruimy, R., Bianchi, A., Daumas, S., & Christen, R. 1996. Bacterial diversity in a deep-subsurface clay environment. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 3405–3412.

- Bombarda, I., Dupuy, N., Da, J.-P.L.V., & Gaydou, E.M. 2008. Comparative chemometric analyses of geographic origins and compositions of lavandin var. Grosso essential oils by mid infrared spectroscopy and gas chromatography. *Analytica Chimica Acta* **613**, 31–39.
- Bourgoin, B., Arnal, G., & Dinger, F. 1989. Paysage, occupation et protection des sols: rôle de la prairie, matériel végétal disponible et à créer. **119**, 312–331.
- Bourrié, G., & Lelong, F. 1994. Les solutions du sol: du profil au bassin versant. *Pédologie* **2**, 239–273.
- Boyle, J.R., Voigt, G.K., & Sawhney, B.L. 1974. Chemical weathering of biotite by organic acids. *Soil Science* **117**, 42–45.
- Brantley, S.L., Liermann, L., Bau, M., & Wu, S. 2001. Uptake of trace metals and rare earth elements from hornblende by a soil bacterium. *Geomicrobiology Journal* **18**, 37–61.
- van Breemen, N. 1973. Dissolved Aluminum in Acid Sulfate Soils and in Acid Mine Waters. *Soil Science Society of America Journal* **37**, 694.
- Breitsameter, L., Kuechenmeister, K., Kuechenmeister, F., & Isselstein, J. 2012. Tolerance to mechanical damage in ten herbaceous grassland plant species. *Plant Soil and Environment* **58**, 334–339.
- Brickett, L.A., Hammack, R.W., & Edenbom, H.M. 1995. Comparison of methods used to inhibit bacterial activity in sulfide ore bioleaching studies. *Hydrometallurgy* **39**, 293–305.
- Brierley, C. 1978. Bacterial Leaching. *Crc Critical Reviews in Microbiology* **6**, 207–262.
- Brown, J.C., & Ambler, J.E. 1973. “Reductants” Released by Roots of Fe-Deficient Soybeans. *Agronomy Journal* **65**, 311.
- Burylo, M., Rey, F., Bochet, E., & Dutoit, T. 2012. Plant functional traits and species ability for sediment retention during concentrated flow erosion. *Plant and Soil* **353**, 135–144.
- Bylka, W., & Kowalewski, Z. 1997. Flawonoidy w *Chenopodium album* L.: 1. *Chenopodium opulifolium* L.(Chenopodiaceae).(Flavonoids in *Chenopodium album* L. and *Chenopodium opulifolium* L.(Chenopodiaceae)). *Herba Pol* **43**, 208–213.
- Calvaruso, C. 2006. Quantification de l’effet des racines d’arbres et des microorganismes associés sur l’altération des minéraux de sols forestiers: observations en forêt et expérimentations.
- Calvaruso, C., Turpault, M.-P., & Frey-Klett, P. 2006. Root-Associated Bacteria Contribute to Mineral Weathering and to Mineral Nutrition in Trees: a Budgeting Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 1258–1266.
- Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A., & Akpulat, H.A. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* **87**, 215–220.
- Carballeira, A., & Cuervo, A. 1980. Seasonal-Variation in Allelopathic Potential of Soils from *Erica-Australis* L Heathland. *Acta Oecologica-Oecologia Plantarum* **1**, 345–353.
- Cebon, A., Louvel, B., Faure, P., France-Lanord, C., Chen, Y., Murrell, J.C., & Leyval, C. 2011. Root exudates modify bacterial diversity of phenanthrene degraders in PAH-polluted soil but not phenanthrene degradation rates. *Environmental Microbiology* **13**, 722–736.
- Cébron, A., Norini, M.-P., Beguiristain, T., & Leyval, C. 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods* **73**, 148–159.
- Chaney, R.L. 1983. Plant uptake of inorganic waste constituents. p. 50–76. *In* Land treatment of hazardous wastes. Parr, J. F.; Marsh, P. B.; Kla, J. M.

- Charpentier, D., Cathelineau, M., Mosser-Ruck, R., & Bruno, G. 2001. Évolution minéralogique des argilites en zone sous-saturée oxydée : exemple des parois du tunnel de Tournemire (Aveyron, France). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science* **332**, 601–607.
- Chavagnat, A. 1978. Study of the Germination of Seeds of *Lavandula-Angustifolia* in the Laboratory. *Seed Science and Technology* **6**, 775–784.
- Chen, Y.-W., Li, Y., Cai, M.-F., Belzile, N., & Dang, Z. 2006. Preventing oxidation of iron sulfide minerals by polyethylene polyamines. *Minerals Engineering* **19**, 19–27.
- Chludil, H.D., Corbino, G.B., & Leicach, S.R. 2008. Soil quality effects on *Chenopodium album* flavonoid content and antioxidant potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 5050–5056.
- Ciccio, J.F. 1997. Essential oils of *Drimys granadensis* (Winteraceae) leaves and green fruits. *Revista De Biologia Tropical* **45**, 29–33.
- Ciminelli, V.S.T., & Osseio-Asare, K. 1995. Kinetics of Pyrite Oxidation in Sodium Hydroxide Solutions. **26B**, 677–685.
- Clauer, N., Fourcade, S., Cathelineau, M., Girard, J.-P., Vincent, B., Elie, M., Buschaert, S., & Rousset, D. 2007. A review of studies on the diagenetic evolution of the Dogger-to-Tithonian sedimentary sequence in the eastern Paris Basin - Impact on the physical and chemical rock properties. , 59–71.
- Colmer, A.R., & Hinkle, M.E. 1947. The Role of Microorganisms in Acid Mine Drainage: A Preliminary Report. *Science (New York, N.Y.)* **106**, 253–256.
- Consentino, S., Tuberoso, C.I., Pisano, B., Satta, M., Arzedi, E., & Palmas, F. 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of sardinian *Thymus* essential oils. **29**, 130–135.
- Corgie, S.C., Beguiristain, T., & Leyval, C. 2004. Spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 3552–3557.
- Couderc-Le-Vaillant, M., & Segur-Fantino, N. 1990. Etude phytodermatologique de *Lavandula angustifolia* Mill. **13**, 75–88.
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12**, 564–+.
- Cruz, R., Lázaro, I., González, I., & Monroy, M. 2005. Acid dissolution influences bacterial attachment and oxidation of arsenopyrite. *Minerals Engineering* **18**, 1024–1031.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., & Huang, J.W. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology* **13**, 393–397.
- Daferera, D.J., Tarantilis, P.A., & Polissiou, M.G. 2002. Characterization of Essential Oils from Lamiaceae Species by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5503–5507.
- Darrah, P. 1993. The Rhizosphere and Plant Nutrition - a Quantitative Approach. *Plant and Soil* **155**, 1–20.
- De Bona, C.M., Biasi, L.A., Lipski, B., Maia Masetto, M.A., & Deschamps, C. 2010. Adventitious rooting of auxin-treated *Lavandula dentata* cuttings. *Ciencia Rural* **40**, 1210–1213.
- De Bona, C.M., Maia Masetto, M.A., Deschamps, C., & Biasi, L.A. 2012. Rooting induction of different *Lavandula angustifolia* accessions by auxin application. *Semina-Ciencias Agrarias* **33**, 175–182.
- De Martino, L., Bruno, M., Formisano, C., De Feo, V., Napolitano, F., Rosselli, S., & Senatore, F. 2009. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from Two Species of *Thymus* Growing Wild in Southern Italy. *Molecules* **14**, 4614–4624.

- Demetzos, C., Perdetzoglou, D.K., & Tan, K. 2001. Composition and antimicrobial studies of the oils of *Origanum calcaratum* Juss. and *O-scabrum* Boiss. et Heldr. from Greece. *Journal of Essential Oil Research* **13**, 460–462.
- Denef, K., Six, J., Bossuyt, H., Frey, S.D., Elliott, E.T., Merckx, R., & Paustian, K. 2001. Influence of dry–wet cycles on the interrelationship between aggregate, particulate organic matter, and microbial community dynamics. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 1599–1611.
- Denef, K., Six, J., Merckx, R., & Paustian, K. 2002. Short-term effects of biological and physical forces on aggregate formation in soils with different clay mineralogy. *Plant and Soil* **246**, 185–200.
- Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S., Mustin, C., Henner, P., Munier-Lamy, C., Colle, C., Berthelin, J., Garnier-Laplace, J., & Leyval, C. 2003. Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces: influence des micro-organismes du sol. Éditions TEC & DOC.
- Dent, D. 1980. Acid Sulphate Soils: Morphology and Prediction. *Journal of Soil Science* **31**, 87–99.
- Dersarkissian, M., & Goodberry, M. 1980. Effectiveness as antifungal preservative. **25**, 28–34.
- Drever, J.I., & Stillings, L.L. 1997. The role of organic acids in mineral weathering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **120**, 167–181.
- Drouet, B., Kongolo, M., & De Donato, P. 1999. Oxydation de la pyrite. Inhibition par des molécules organiques. Ecole Nationale Supérieure de Géologie, Vandoeuvre-lès-Nancy.
- Duchaufour, P. 1983. *Pedologie 1 Pedogenese et classification*. Masson, Paris.
- Duponnois, R., Ouahmane, L., Kane, A., Thioulouse, J., Hafidi, M., Boumezzough, A., Prin, Y., Baudoin, E., Galiana, A., & Dreyfus, B. 2011. Nurse shrubs increased the early growth of *Cupressus* seedlings by enhancing belowground mutualism and soil microbial activity. *Soil Biology & Biochemistry* **43**, 2160–2168.
- Durán Zuazo, V.H., Rodríguez Pleguezuelo, C.R., Francia Martínez, J.R., Cárceles Rodríguez, B., Martínez Raya, A., & Pérez Galindo, P. 2008a. Harvest intensity of aromatic shrubs vs. soil erosion: An equilibrium for sustainable agriculture (SE Spain). *CATENA* **73**, 107–116.
- Durán Zuazo, V.H., Rodríguez Pleguezuelo, C.R., Francia Martínez, J.R., Cárceles Rodríguez, B., Martínez Raya, A., & Pérez Galindo, P. 2008b. Harvest intensity of aromatic shrubs vs. soil erosion: An equilibrium for sustainable agriculture (SE Spain). *CATENA* **73**, 107–116.
- Ehrlich, H.L. 1981. *Geomicrobiology*.
- El Kalamouni, C. 2010. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées.
- Elie, M., Faure, P., Michels, R., Landais, P., Griffault, L., Mansuy, L., & Martinez, L. 2004. Effects of water–cement solutions on the composition of organic compounds leached from oxidized Callovo–Oxfordian argillaceous sediment. *Applied Clay Science* **26**, 309–323.
- Elsetinow, A.R., Schoonen, M. a. A., & Strongin, D.R. 2001. Aqueous geochemical and surface science investigation of the effect of phosphate on pyrite oxidation. *Environmental Science & Technology* **35**, 2252–2257.
- Elwell, H.A., & Stocking, M.A. 1976. Vegetal cover to estimate soil erosion hazard in Rhodesia. *Geoderma* **15**, 61–70.
- Esnault, L., Libert, M., Bildstein, O., Mustin, C., Marsal, F., & Jullien, M. 2013. Impact of iron-reducing bacteria on the properties of argillites in the context of radioactive waste geological disposal. *Applied Clay Science* **83–84**, 42–49.

- Estévez, M., Juan, R., Ruiz, C., & Andrés, J. 1990. Formation of humic acids in lignites and subbituminous coals by dry air oxidation. *Fuel* **69**, 157–160.
- Evangelou, V.P. 1995. Pyrite oxidation and its control. CRC.
- Evangelou, V.P. 1996. Oxidation proof silicate surface coating on iron sulfides.
- Evans, A., & Anderson, T. 1990. Aliphatic-Acids - Influence on Sulfate Mobility in a Forested Cecil Soil. *Soil Science Society of America Journal* **54**, 1136–1139.
- Fakhari, A.R., Salehi, P., Heydari, R., Ebrahimi, S.N., & Haddad, P.R. 2005. Hydrodistillation-headspace solvent microextraction, a new method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Chromatography A* **1098**, 14–18.
- Faure, P., Landais, P., & Griffault, L. 1999. Behavior of organic matter from Callovian shales during low-temperature air oxidation. *Fuel* **78**, 1515–1525.
- Fazal, H., Ahmad, N., Abbasi, B.H., & Abbass, N. 2012. Selected Medicinal Plants Used in Herbal Industries; Their Toxicity Against Pathogenic Microorganisms. *Pakistan Journal of Botany* **44**, 1103–1109.
- Felske, A., Akkermans, A.D., & De Vos, W.M. 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 4581–4587.
- Ferret, C., Sterckeman, T., Cornu, J.-Y., Gangloff, S., Schalk, I.J., & Geoffroy, V.A. 2014. Siderophore-promoted dissolution of smectite by fluorescent *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology Reports* **6**, 459–467.
- Friedman, M., Henika, P.R., & Mandrell, R.E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* **65**, 1545–1560.
- Fru, E.C., & Athar, R. 2008. In situ bacterial colonization of compacted bentonite under deep geological high-level radioactive waste repository conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **79**, 499–510.
- Fuehner, C., & Runge, M. 2009. Are Fe and P availabilities involved in determining the occurrence and distribution of *Calluna vulgaris* (L.) Hull in semi-arid grasslands on calcareous soils? *Plant and Soil* **316**, 161–176.
- Fukunaga, S., Jintoku, T., Iwata, Y., Nakayama, M., Tsuji, T., Sakaya, N., Mogi, K., & Ito, A. 2005. Investigation of microorganisms in bentonite deposits. *Geomicrobiology Journal* **22**, 361–370.
- Fytas, K., Bousquet, P., & Evangelou, B. 2000. Silicate coating technology to prevent acid mine drainage. Soc Mining Metallurgy and Exploration Inc, Littleton.
- Gadd, G.M. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research* **111**, 3–49.
- García-Vallejo, M. 1992. Aceites esenciales de las Lavandulas ibéricas: ensayo de la quimiotaxonomía.
- Garrels, R., & Thompson, M. 1960. Oxidation of pyrite by iron sulfate solutions. **258.A**, 57–67.
- Gaucher, E., Robelin, C., Matray, J.M., Négrel, G., Gros, Y., Heitz, J.F., Vinsot, A., Rebours, H., Cassagnabère, A., & Bouchet, A. 2004. ANDRA underground research laboratory: interpretation of the mineralogical and geochemical data acquired in the Callovian–Oxfordian formation by investigative drilling. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* **29**, 55–77.

- Giammar, D.E., Bruant, R.G., & Peters, C.A. 2005. Forsterite dissolution and magnesite precipitation at conditions relevant for deep saline aquifer storage and sequestration of carbon dioxide. *Chemical Geology* **217**, 257–276.
- Gleisner, M., & Herbert Jr., R.B. 2002. Sulfide mineral oxidation in freshly processed tailings: batch experiments. *Journal of Geochemical Exploration* **76**, 139–153.
- Golubev, S.V., Bauer, A., & Pokrovsky, O.S. 2006a. Effect of pH and organic ligands on the kinetics of smectite dissolution at 25 degrees C. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **70**, 4436–4451.
- Golubev, S.V., Bauer, A., & Pokrovsky, O.S. 2006b. Effect of pH and organic ligands on the kinetics of smectite dissolution at 25 °C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **70**, 4436–4451.
- Greenway, H., & Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **31**, 149–190.
- Griffiths, B.S., Ritz, K., Ebbelwhite, N., & Dobson, G. 1998. Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates. *Soil Biology and Biochemistry* **31**, 145–153.
- Grøndahl, E., & Ehlers, B.K. 2008. Local adaptation to biotic factors: reciprocal transplants of four species associated with aromatic *Thymus pulegioides* and *T. serpyllum*. *Journal of Ecology* **96**, 981–992.
- Grubb, P., & Merrifield, R. 1969. The ecology of chalk heath: its relevance to the calcicole-calcifuge and soil acidification problems. **57**, 175–212.
- Guillen, M.D., & Manzanos, M.J. 1998. Study of the composition of the different parts of Spanish *Thymus vulgaris* L. plants. **63**, 373–383.
- Guitton, Y. 2010. Diversité des composés terpéniques volatils au sein du genre *Lavandula*: aspects évolutifs et physiologiques. Available at <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00675866> (verified 4 October 2012).
- Gutiérrez-Larraínzar, M., Rúa, J., Caro, I., de Castro, C., de Arriaga, D., García-Armesto, M.R., & del Valle, P. 2012. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control* **26**, 555–563.
- Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., & Riechel, T.L. 1998. High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 1887–1892.
- Hassiotis, C.N., Tarantilis, P.A., Daferera, D., & Polissiou, M.G. 2010. Etherio, a new variety of *Lavandula angustifolia* with improved essential oil production and composition from natural selected genotypes growing in Greece. *Industrial Crops and Products* **32**, 77–82.
- Hauteville, Y. 2005. Géochimie organique des séries argilo-carbonatées du Callovo-Oxfordien de l'Est du bassin de Paris et d'Angleterre. Variabilités et implications paléoenvironnementales.
- He, M., Du, M., Fan, M., & Bian, Z. 2007. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* **163**, 137–143.
- van Hees, P. a. W., Godbold, D.L., Jentschke, G., & Jones, D.L. 2003. Impact of ectomycorrhizas on the concentration and biodegradation of simple organic acids in a forest soil. *European Journal of Soil Science* **54**, 697–706.
- Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., & von Wright, A. 1998. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 3590–3595.

- Henrichs, S.M., & Sugai, S.F. 1993. Adsorption of amino acids and glucose by sediments of Resurrection Bay, Alaska, USA: Functional group effects. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **57**, 823–835.
- Hersman, L., Lloyd, T., & Sposito, G. 1995. Siderophore-Promoted Dissolution of Hematite. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **59**, 3327–3330.
- Hingston, F., Posner, A., & Quirk, J. 1974. Anion Adsorption by Goethite and Gibbsite .2. Desorption of Anions from Hydrous Oxide Surfaces. *Journal of Soil Science* **25**, 16–26.
- Hinsinger, P. 1998. How Do Plant Roots Acquire Mineral Nutrients? Chemical Processes Involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy* **64**, 225–265.
- Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D., & Young, I.M. 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and soil* **321**, 117–152.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C.X., & Jaillard, B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil* **248**, 43–59.
- Hirsch, P., Eckhardt, F.E.W., & Palmer, R.J. 1995. Methods for the study of rock-inhabiting microorganisms—A mini review. *Journal of Microbiological Methods* **23**, 143–167.
- Hsu, C.-Y. 2006. Antioxidant activity of extract from *Polygonum aviculare* L. *Biological Research* **39**, 281–288.
- Huang, P., Wang, T., Wang, M., Wu, M., & Hsu, N. 1977. Retention of Phenolic Acids by Non-Crystalline Hydroxy-Aluminum and Hydroxy-Iron Compounds and Clay-Minerals of Soils. *Soil Science* **123**, 213–219.
- Hudson, J.P. 1967. Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition By E. J. Hewitt Farnham Royal, England: Commonwealth Agricultural Bureaux (1966), pp. 547, Technical Communication No. 22 (Revised 2nd Edition) of the Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops, East Malling, Maidstone, Kent. *Experimental Agriculture* **3**, 104–104.
- Hutchens, E., McDermott, F.P., & Clipson, N. 2008. Bacteria, fungi and archaea on silicate minerals - A case for selective colonization. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **72**, A404–A404.
- Imelouane, B., Amhamdi, H., Wathelet, J.P., Ankit, M., Khedid, K., & El Bachiri, A. 2009. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agriculture and Biology* **11**, 205–208.
- Jiménez-Osornio, F.M.V.Z.J., Kumamoto, J., & Wasser, C. 1996. Allelopathic activity of *Chenopodium ambrosioides* L. *Biochemical Systematics and Ecology* **24**, 195–205.
- Johansson, M. 2001. Fungal associations of Danish *Calluna vulgaris* roots with special reference to ericoid mycorrhiza. *Plant and Soil* **231**, 225–232.
- Joner, E.J., Corgié, S.C., Amellal, N., & Leyval, C. 2002. Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **34**, 859–864.
- Joner, E.J., & Leyval, C. 2003. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environmental science & technology* **37**, 2371–2375.
- Jones, D.L. 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil* **205**, 25–44.
- Jones, D., & Darrah, P. 1994. Role of Root Derived Organic-Acids in the Mobilization of Nutrients from the Rhizosphere. *Plant and Soil* **166**, 247–257.
- Kalin, M., & Van Everdingen, R.O. 1988. Ecological engineering: Biological and geochemical aspects phase I experiments. *Environmental Management of Solid*



- Waste: Dredged Material and Mine Tailings*. Springer-Verlag, New York NY. 1988. p 114-128.
- Kalinowski, B.E., Oskarsson, A., Albinsson, Y., Arlinger, J., Ödegaard-Jensen, A., Andlid, T., & Pedersen, K. 2004. Microbial leaching of uranium and other trace elements from shale mine tailings at Ranstad. *Geoderma* **122**, 177–194.
- Kamimura, J.A., Santos, E.H., Hill, L.E., & Gomes, C.L. 2014. Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *LWT - Food Science and Technology* **57**, 701–709.
- Kara, N., & Baydar, H. 2013. Determination of lavender and lavandin cultivars (*lavandula* sp.) Containing high quality essential oil in Isparta, Turkey. *TURKISH JOURNAL OF FIELD CROPS* **18**, 58–65.
- Kargbo, D.M., Atallah, G., & Chatterjee, S. 2004. Inhibition of pyrite oxidation by a phospholipid in the presence of silicate. *Environmental Science & Technology* **38**, 3432–3441.
- Kim, D.-K. 2001. Antioxidative components from the aerial Parts of *Lactuca scariola* L. *Archives of Pharmacal Research* **24**, 427–430.
- Kim, J., Dong, H.L., Seabaugh, J., Newell, S.W., & Eberl, D.D. 2004. Role of microbes in the smectite-to-illite reaction. *Science* **303**, 830–832.
- Kim, M.-H., Hee Park, J., & Park, C.-W. 2000. Flavonoid chemistry of *Fallopia* section *Fallopia* (Polygonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **28**, 433–441.
- Kim, N.-S., & Lee, D.-S. 2002. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **982**, 31–47.
- Kim, M.-R., Lee, J.Y., Lee, H.-H., Aryal, D.K., Kim, Y.G., Kim, S.K., Woo, E.-R., & Kang, K.W. 2006. Antioxidative effects of quercetin-glycosides isolated from the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food and Chemical Toxicology* **44**, 1299–1307.
- Knight, T., & Hausen, B. 1994. *Melaleuca* Oil (tea Tree Oil) Dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* **30**, 423–427.
- Kokoska, L., Polesny, Z., Rada, V., Nepovim, A., & Vanek, T. 2002. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **82**, 51–53.
- Koske, R.E., & Gemma, J.N. 1989. A modified procedure for staining roots to detect V-A mycorrhizas. *Mycological Research* **92**, 486–488.
- Kostka, J.E., Dalton, D.D., Skelton, H., Dollhopf, S., & Stucki, J.W. 2002a. Growth of Iron(III)-Reducing Bacteria on Clay Minerals as the Sole Electron Acceptor and Comparison of Growth Yields on a Variety of Oxidized Iron Forms. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 6256–6262.
- Kostka, J.E., Dalton, D.D., Skelton, H., Dollhopf, S., & Stucki, J.W. 2002b. Growth of iron(III)-reducing bacteria on clay minerals as the sole electron acceptor and comparison of growth yields on a variety of oxidized iron forms. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 6256–6262.
- Kostka, J.E., Wu, J., Nealson, K.H., & Stucki, J.W. 1999. The impact of structural Fe(III) reduction by bacteria on the surface chemistry of smectite clay minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**, 3705–3713.
- Kotsiris, G., Nektarios, P.A., & Paraskevopoulou, A.T. 2012. *Lavandula angustifolia* Growth and Physiology Is Affected by Substrate Type and Depth When Grown under Mediterranean Semi-intensive Green Roof Conditions. *Hortscience* **47**, 311–317.
- Kraus, T.E.C., Dahlgren, R.A., & Zasoski, R.J. 2003. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. *Plant and Soil* **256**, 41–66.

- Krausz, P., Costa, G., Lhernould, S., Lejolly, D., Bauby, C., Cellier, J.L., Chucho, J., Cousseau, G., Galan, V., Juan, P., Martin, A., Peyronnet, R., & Radet-Taligot, C. Phytoremédiation du terril de la mine d'or de Chéni pollué par l'Arsenic.
- Kurkcuoglu, M., Baser, K.H.C., & Vural, M. 2006. Composition of the essential oil of *Pastinaca sativa* L. subsp. *urens* (Req. ex Godron) Celak. *Chemistry of Natural Compounds* **42**, 114–115.
- L'Achillée Millefeuille: Guide de production sous régime biologique. 2009. *Filière des Plantes Médicinales biologiques du Québec*.
- Lalvani, S.B., Zhang, G., & Lalvani, L.S. 1996. Coal pyrite passivation due to humic acids and lignin treatment. *Fuel science & technology international* **14**, 1291–1313.
- Lambert, R. j. w., Skandamis, P. n., Coote, P. j., & Nychas, G.-J. e. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* **91**, 453–462.
- Lanson, B. 1990. Mise en évidence des mécanismes de transformation des interstratifiés illite/smectite au cours de la diagenèse. Available at <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00778555/document> (verified 15 September 2015).
- Lantenois, S., Lanson, B., Muller, F., Bauer, A., Jullien, M., & Plançon, A. 2005. Experimental study of smectite interaction with metal Fe at low temperature: 1. Smectite destabilization. *Clays and Clay Minerals* **53**, 597–612.
- Lawrence, B.M. 1979. Essential oils.
- Lee, S.-J., Umamo, K., Shibamoto, T., & Lee, K.-G. 2005. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry* **91**, 131–137.
- Lerouge, C., Grangeon, S., Gaucher, E.C., Tournassat, C., Agrinier, P., Guerrot, C., Widory, D., Flehoc, C., Wille, G., Ramboz, C., Vinsot, A., & Buschaert, S. 2011. Mineralogical and isotopic record of biotic and abiotic diagenesis of the Callovian-Oxfordian clayey formation of Bure (France). *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **75**, 2633–2663.
- Leyval, C., & Berthelin, J. 1989. Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: Influence on P, K, Mg, and Fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant and Soil* **117**, 103–110.
- Leyval, C., & Berthelin, J. 1991. Weathering of a Mica by Roots and Rhizospheric Microorganisms of Pine. *Soil Science Society of America Journal* **55**, 1009–1016.
- Leyval, C., & Joner, E.J. 2001. Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere. *Trace elements in the rhizosphere*, 165–185.
- Leyval, C., Laheurte, F., Belgy, G., & Berthelin, J. 1990. Weathering of Micaceous in the Rhizospheres of Maize, Pine and Beech Seedlings Influenced by Mycorrhizal and Bacterial Inoculation. *Symbiosis* **9**, 105–109.
- 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.
- Liopa-Tsakalidi, A., Zakyntinos, G., Varzakas, T., & Xynias, L.N. 2011a. Effect of NaCl and GA3 on seed germination and seedling growth of eleven medicinal and aromatic crops. **5(17)**, 4065–4073.
- Liopa-Tsakalidi, A., Zakyntinos, G., Varzakas, T., & Xynias, I.N. 2011b. Effect of NaCl and GA(3) on seed germination and seedling growth of eleven medicinal and aromatic crops. *Journal of Medicinal Plants Research* **5**, 4065–4073.
- Lourenco, P.M.L., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Oliveira, M.M., Deans, S.G., & Scheffer, J.J.C. 1999. Essential oils from hairy root cultures and from plant roots of *Achillea millefolium*. *Phytochemistry* **51**, 637–642.

- Lovley, D.R., Coates, J.D., BluntHarris, E.L., Phillips, E.J.P., & Woodward, J.C. 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* **382**, 445–448.
- Lowson, R.T. 1982. Aqueous oxidation of pyrite by molecular oxygen. *Chemical Reviews* **82**, 461–497.
- Ložienė, K., & Venskutonis, P.R. 2005. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochemical Systematics and Ecology* **33**, 517–525.
- Ložienė, K., Venskutonis, P.R., Šipailienė, A., & Labokas, J. 2007. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry* **103**, 546–559.
- Lueders, T., Wagner, B., Claus, P., & Friedrich, M.W. 2004. Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylophilic community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology* **6**, 60–72.
- Manaka, M. 2009. Comparison of rates of pyrite oxidation by dissolved oxygen in aqueous solution and in compacted bentonite. *Journal of Mineralogical and Petrological Sciences* **104**, 59–68.
- Mantilla, J.L.. 1974. Estudio de los factores de crecimiento y germinación de *Calluna vulgaris* (L.).
- Marius, C. 1984. Contribution à l'étude des mangroves du Sénégal et de la Gambie : écologie-pédologie-géochimie : mise en valeur et aménagement : résumé de thèse. *Cahiers ORSTOM.Série Pédologie* **21**, 127–131.
- Marschner, P. 2012. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press.
- Marschner, P., Crowley, D.E., & Higashi, R.M. 1997. Root exudation and physiological status of a root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L). *Plant and Soil* **189**, 11–20.
- Marschner, H., Romheld, V., Horst, W., & Martin, P. 1986. Root-Induced Changes in the Rhizosphere - Importance for the Mineral-Nutrition of Plants. *Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* **149**, 441–456.
- Marulanda, A., Porcel, R., Barea, J.M., & Azcón, R. 2007. Drought Tolerance and Antioxidant Activities in Lavender Plants Colonized by Native Drought-tolerant or Drought-sensitive *Glomus* Species. *Microbial Ecology* **54**, 543–552.
- Mastretta, C., Barac, T., Vangronsveld, J., Newman, L., Taghavi, S., & Van der Lelie, D. 2006. Endophytic bacteria and their potential application to improve the phytoremediation of contaminated environments. *Biotechnology & genetic engineering reviews* **23**, 175–207.
- McLafferty, F.W., & Stauffer, D.B. 1989. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data. Wiley.
- Meek, A. 1991. —Assessment of acid preventative techniques at the island creek mining co. tenmile site,""In proceedings annual west virginia surface mine drainage task force symposium.
- Méline, F. 1995. Interactions à l'interface *Thiobacillus ferrooxidans*/pyrite: Inhibition et adhésion.
- Méline, F., Mustin, C., & deDonato, P. 1996. Adsorption of thymol can limit bacterial oxidation of pyrite. *Comptes Rendus De L'Academie Des Sciences Serie II* **322**, 959–964.
- Mickiene, R., Maruska, A., & Ragazinskiene, O. 2012. Investigation of Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils of *Lavandula Hybrid* L., *Cymbopogon Flexuosus* L., *Malaleuca Alternifolia* L. (F Foret, J Krenkova, A

- Guttman, K Kleparnik, and P Bocek, Eds.). *Cece 2012: 9th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*, 333–337.
- Mitich, L.W. 1996. Wild carrot (*Daucus carota* L.). p. 455–457. In *Weed technology*. Weed Science Society of America.
- Morcia, C., Malnati, M., & Terzi, V. 2012. In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* **29**, 415–422.
- Moses, C., & Herman, J. 1991. Pyrite Oxidation at Circumneutral Ph. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **55**, 471–482.
- Moses, C.O., Kirk Nordstrom, D., Herman, J.S., & Mills, A.L. 1987. Aqueous pyrite oxidation by dissolved oxygen and by ferric iron. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **51**, 1561–1571.
- Mota, J.F., Medina-Cazorla, J.M., Pérez-García, F.J., Pérez-Latorre, A., Sanchez-Gomez, P., Torres, J.A., Benavente, A., Blanca, G., Gil, C., Lorite, J., & Merlo, M.E. 2008. Dolomite flora of the Baetic Ranges glades (South Spain). , 359–375.
- Motamedi, M., Karland, O., & Pedersen, K. 1996. Survival of sulfate reducing bacteria at different water activities in compacted bentonite. *FEMS Microbiology Letters* **141**, 83–87.
- Muller, E. 2012. Etude sur la valorisation des vers issues du futur centre de stockage de déchets radioactifs de Bure (55) et suivi de l'installation d'une plateforme lysimétrique. Université de Lorraine, Nancy.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. **25**, 239–250.
- Mustin, C. 1992. Approche physico-chimique et modélisation de l'oxydation bactérienne de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans*: rôle déterminant de la phase minérale.
- Mustin, C., Berthelin, J., Marion, P., & Dedonato, P. 1992. Corrosion and Electrochemical Oxidation of a Pyrite by *Thiobacillus-Ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1175–1182.
- Mustin, C., Dedonato, P., & Berthelin, J. 1993. Surface Oxidized Species, a Key Factor in the Study of Bioleaching Processes .2. Investigation of Superficial Oxidized Species Developed During the Bacterial Oxidation of Pyrite by *Thiobacillus-Ferrooxidans* (AE Torma, JE Wey, and VI Lakshmanan, Eds.). *Minerals, Metals & Materials Soc*, Warrendale.
- Naik, P.M., Kakkalameeli, S.B., Naik, P.M., Nagella, P., Seetharamareddy, H.R., & Murthy, H.N. 2010. Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. *Food Chemistry* **118**, 836–839.
- Navarro-Fernandez, C.M., Aroca, R., & Barea, J.M. 2011. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and water regime on the development of endemic *Thymus* species in dolomitic soils. *Applied Soil Ecology* **48**, 31–37.
- Nehir El, S., & Karakaya, S. 2004. Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **55**, 67–74.
- Neilands, J.B. 1984. Siderophores of bacteria and fungi. *Microbiological Sciences* **1**, 9–14.
- Newman, D.K., & Kolter, R. 2000. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature* **405**, 94–97.
- Nicholson, R.V., Gillham, R.W., & Reardon, E.J. 1988. Pyrite oxidation in carbonate-buffered solution: 1. Experimental kinetics. **52**, 1077–1085.
- Nobre, J. 1996. In vitro cloning and micropropagation of *Lavandula Stoechas* from field-grown plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **46**, 151–155.

- Nordstrom, D.K. 1982. Aqueous pyrite oxidation and the consequent formation of secondary minerals. *Soil Sci. Soc. Am. Spec. Publ* **10**, 37–56.
- Nordstrom, D.K., & Alpers, C.N. 1997. The Environmental geochemistry of mineral deposits. Part A. Processes, methods and health Issues. *Reviews in Economic Geology* **6**.
- Noyere, B. 2012. Relevés floristiques des plantes herbacées des versés du Laboratoire Souterrain de l'Andra à Bure.
- Numanoglu, U., Sen, T., Tarimci, N., Kartal, M., Koo, O.M.Y., & Oenyueksel, H. 2007. Use of cyclodextrins as a cosmetic delivery system for fragrance materials: Linalool and benzyl acetate. *Aaps Pharmscitech* **8**, 85.
- Obernosterer, I., Kraay, G., de Ranitz, E., & Herndl, G.J. 1999. Concentrations of low molecular weight carboxylic acids and carbonyl compounds in the Aegean Sea (Eastern Mediterranean) and the turnover of pyruvate. *Aquatic Microbial Ecology* **20**, 147–156.
- Orav, A., Arak, E., & Raal, A. 2006. Phytochemical analysis of the essential oil of *Achillea millefolium* L. from various European Countries. *Natural Product Research* **20**, 1082–1088.
- Ouahmane, L., Duponnois, R., Hafidi, M., Kisa, M., Boumezouch, A., Thioulouse, J., & Plenchette, C. 2006a. Some Mediterranean plant species (*Lavandula* spp. and *Thymus satureioides*) act as potential “plant nurses” for the early growth of *Cupressus atlantica*. *Plant Ecology* **185**, 123–134.
- Ouahmane, L., Hafidi, M., Plenchette, C., Kisa, M., Bournezzough, A., Thioulouse, J., & Duponnois, R. 2006b. *Lavandula* species as accompanying plants in *Cupressus* replanting strategies: Effect on plant growth, mycorrhizal soil infectivity and soil microbial catabolic diversity. *Applied Soil Ecology* **34**, 190–199.
- Oulkadi, D., Balland-Bolou-Bi, C., Billard, P., Kitzinger, G., Parrello, D., Mustin, C., & Banon, S. 2014. Interactions of three soil bacteria species with phyllosilicate surfaces in hybrid silica gels. *Fems Microbiology Letters* **354**, 37–45.
- Ozkan, G., Sagdic, O., Gokturk, R.S., Unal, O., & Albayrak, S. 2010. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extract from *Salvia pisdica*. *LWT - Food Science and Technology* **43**, 186–190.
- Paavery, U., Orav, A., Arak, E., Maeorg, U., & Raal, A. 2008. Phytochemical analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Estonia. *Natural Product Research* **22**, 108–115.
- Palenzuela, J., Ferrol, N., Boller, T., Azcón-Aguilar, C., & Oehl, F. 2008. *Otospora bareai*, a new fungal species in the Glomeromycetes from a dolomitic shrub land in Sierra de Baza National Park (Granada, Spain). *Mycologia* **100**, 296–305.
- Parfitt, R.L. 1979. Anion Adsorption by Soils and Soil Materials. p. 1–50. *In* Advances in Agronomy. Elsevier.
- Parra, A., Zornoza, R., Conesa, E., Gómez-López, M.D., & Faz, A. 2014. Seedling emergence, growth and trace elements tolerance and accumulation by Lamiaceae species in a mine soil. *Chemosphere* **113**, 132–140.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M., & Kole, C.R. 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* **89**, 39–46.
- Pavel, M., Ristic, M., & Stevic, T. 2010. Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of the Serbian Chemical Society* **75**, 27–34.
- Pawlowska, T.E., Blaszkowski, J., & Ruhling, A. 1996. The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland. *Mycorrhiza* **6**, 499–505.
- Peiffer, S., & Stubert, I. 1999. The oxidation of pyrite at pH 7 in the presence of reducing and nonreducing Fe(III)-chelators. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**, 3171–3182.

- Pelmont, J. 2012. Biodégradations et métabolismes. EDP Sciences.
- Peñuelas, J., & Munné-Bosch, S. 2005. Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends in Plant Science* **10**, 166–169.
- Perdicakis, M., Geoffroy, S., Grosselin, N., & Bessière, J. 2001. Application of the scanning reference electrode technique to evidence the corrosion of a natural conducting mineral: pyrite. Inhibiting role of thymol. *Electrochimica Acta* **47**, 211–216.
- Perez-Alfonso, C.O., Martinez-Romero, D., Zapata, P.J., Serrano, M., Valero, D., & Castillo, S. 2012. The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. *International Journal of Food Microbiology* **158**, 101–106.
- Perrin, A., & Colson, M. 1986. L'appareil sécréteur des lavandes et des lavandins. , 61–63.
- Peters, E., & Majima, H. 1968. Electrochemical reactions of pyrite in acid perchlorate solutions. *Canadian Metallurgical Quarterly* **7**, 111–117.
- Picone, G., Laghi, L., Gardini, F., Lanciotti, R., Siroli, L., & Capozzi, F. 2013. Evaluation of the effect of carvacrol on the *Escherichia coli* 555 metabolome by using H-1-NMR spectroscopy. *Food Chemistry* **141**, 4367–4374.
- Pisapia, C., Chaussidon, M., Mustin, C., & Humbert, B. 2007. O and S isotopic composition of dissolved and attached oxidation products of pyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*: Comparison with abiotic oxidations. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **71**, 2474–2490.
- Pisapia, C., Humbert, B., Chaussidon, M., & Mustin, C. 2008. Perforative corrosion of pyrite enhanced by direct attachment of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Geomicrobiology Journal* **25**, 261–273.
- Plenchette, C., Fortin, J., & Furlan, V. 1983. Growth-Responses of Several Plant-Species to Mycorrhizae in a Soil of Moderate P-Fertility .1. Mycorrhizal Dependency Under Field Conditions. *Plant and Soil* **70**, 199–209.
- Pluzhnikov, V., & Kovtun, G. 1994. Radical-Chain Mechanism of Alpha-Terpinene Oxidation by Molecular-Oxygen. *Teoreticheskaya I Eksperimentalnaya Khimiya* **30**, 143–146.
- Porchezhian, E., Ansari, S.H., & Ali, M. 2000. Analgesic and anti-inflammatory activity of volatile oil from *Daucus carota* Linn seeds. *Indian Journal of Natural Products* **16**, 24–26.
- Powell, P.E., Cline, G.R., Reid, C.P.P., & Szaniszló, P.J. 1980. Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. *Nature* **287**, 833–834.
- Puura, E., & Neretnieks, I. 2000. Atmospheric oxidation of the pyritic waste rock in Maardu, Estonia, 2: an assessment of aluminosilicate buffering potential. **39**, 560–566.
- Raichur, A.M., Wang, X.H., & Parekh, B.K. 2000. Quantifying pyrite surface oxidation kinetics by contact angle measurements. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **167**, 245–251.
- Rakotondratsima, L.Y.. 1995. Mécanismes de gonflement et d'altération des schistes carton.
- Ramanankieran, N., Rakotoarimang, N., Thioulouse, J., Kisa, M., Randrianjohany, E., Ramorison, L., & Duponnois, R. 2006. The ectomycorrhizo-sphere effect influences functional diversity of soil microflora. **1**, 8–19.
- Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Matos, O., Serrano, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Nunes, M.L., & Marques, A. 2012. Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. *Natural Product Research* **26**, 518–529.
- Ranger, J., Goutal Pousse, N., & Bonnaud, P. 2012. Effet de la mécanisation des travaux sylvicoles sur la qualité des sols forestiers: dynamique de la restauration naturelle ou assistée de leurs propriétés physiques.

- Rath, R.K., Subramanian, S., & Pradeep, T. 2000. Surface Chemical Studies on Pyrite in the Presence of Polysaccharide-Based Flotation Depressants. *Journal of Colloid and Interface Science* **229**, 82–91.
- Reeves, R.D., & Baker, A.J. 2000. Metal-accumulating plants. p. 193–229. *In* Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. Wiley. New York.
- Renaud, E.N.C., Charles, D.J., & Simon, J.E. 2001. Essential oil quantity and composition from 10 cultivars of organically grown lavender and lavandin. *Journal of Essential Oil Research* **13**, 269–273.
- Ritsema, C.J., & Groenenberg, J.E. 1993. Pyrite oxidation, carbonate weathering, and gypsum formation in a drained potential acid sulfate soil. **57**, 968–976.
- Robert, M., & Berthelin, J. 1986. Role of Biological and Biochemical Factors in Soil Mineral Weathering. *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes*, 453–495.
- Rota, M.C., Herrera, A., Martinez, R.M., Sotomayor, J., & Jordan, M.J. 2007. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **19**, 681–687.
- Rousset, D. 2002. Etude de la fraction argileuse de séquences sédimentaires de la Meuse et du Gard. Reconstitution de l'histoire diagénétique et des caractéristiques physico-chimiques des cibles.
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J.A., & Fernandez-Lopez, J. 2012. Chemical characterization and antibacterial activity of *Thymus moroderi* and *Thymus piperella* essential oils, two *Thymus* endemic species from southeast of Spain. *Food Control* **27**, 294–299.
- Ruminska, A., Suchorska, K., & Weglarz, Z. 1978. Effect of Gibberellic acid on seeds germination of some vegetable and medicinal plants. , 131–136.
- Sanchez-Castro, I., Ferrol, N., & Barea, J.M. 2012. Analyzing the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing the roots of representative shrubland species in a Mediterranean ecosystem. *Journal of Arid Environments* **80**, 1–9.
- Sayles, F.L., & Mangelsdorf, P.C. 1977. The equilibration of clay minerals with sea water: exchange reactions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **41**, 951–960.
- Schaffer, J.M., & Tilley, F.W. 1927. Further investigations of the relation between the chemical constitution and the germicidal activity of alcohols and phenols. *Journal of Bacteriology* **14**, 259–273.
- Scholtus, N. 2003. Altération pédogénétique des argilites du Callovo-Oxfordien soumises à la végétalisation.
- Scholtus, N., Echevarria, G., Florentin, L., Bonis, M.-L., De Donato, P., Simonnot, M.-O., & Morel, J.-L. 2015. Expected evolution of a Technosol derived from excavated Callovo-Oxfordian clay material. *Journal of Soils and Sediments* **15**, 332–346.
- Scholtus, N., Leclerc, E., De Donato, P., Morel, J.L., & Simonnot, M.O. 2009. Eluto-frontal chromatography to simulate chemical weathering of COx by low-molecular-weight organic compounds and early pedogenesis processes. *European Journal of Soil Science* **60**, 71–83.
- Scortichini, M., & Rossi, M. 1991. Preliminary In vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Terpenes and Terpenoids Towards *Erwinia-Amylovora* (burrill) Winslow Et-Al. *Journal of Applied Bacteriology* **71**, 109–112.
- Sellami, I.H., Rebey, I.B., Sriti, J., Rahali, F.Z., Limam, F., & Marzouk, B. 2012. Drying Sage (*Salvia officinalis* L.) Plants and Its Effects on Content, Chemical Composition, and Radical Scavenging Activity of the Essential Oil. *Food and Bioprocess Technology* **5**, 2978–2989.

- Sierra, M.J., Millán, R., & Esteban, E. 2009. Mercury uptake and distribution in *Lavandula stoechas* plants grown in soil from Almadén mining district (Spain). *Food and Chemical Toxicology* **47**, 2761–2767.
- Sierra, M.J., Rodríguez-Alonso, J., & Millán, R. 2012. Impact of the lavender rhizosphere on the mercury uptake in field conditions. *Chemosphere* **89**, 1457–1466.
- Sikkema, J., Debont, J., & Poolman, B. 1995. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews* **59**, 201–222.
- Singer, A.C., Crowley, D.E., & Thompson, I.P. 2003. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology* **21**, 123–130.
- Singer, P.C., & Stumm, W. 1970. Acidic Mine Drainage: The Rate-Determining Step. *Science* **167**, 1121–1123.
- Skocibusic, M., Bezic, N., & Dunkic, V. 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activities of essential oils from *Satureja subspicata* Vis. Growing in Croatia. **96**, 20–28.
- Smith, S.E., & Read, D.J. 2010. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press.
- Sochor, J., Ryvolova, M., Krystofova, O., Salas, P., Hubalek, J., Adam, V., Trnkova, L., Havel, L., Beklova, M., Zehnalek, J., Provaznik, I., & Kizek, R. 2010. Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules* **15**, 8618–8640.
- Soltanpour, P.N., & Schwab, A.P. 1977. A new soil test for simultaneous extraction of macro- and micro-nutrients in alkaline soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **8**, 195–207.
- Sorrenti, E. 2007. Etude de la Passivation de la Pyrite: Chimie de Surface et Réactivité.
- Sotomayor, J.A., Martinez, R.M., Garcia, A.J., & Jordan, M.J. 2004. *Thymus zygis* subsp. *Gracilis*: Watering level effect on phytomass production and essential oil quality. **52**, 5418–5424.
- Srivastava, M., Saxena, A., & Baby, P. 1999. GC-MS investigation and antimicrobial activity of the essential oil of *Carum copticum* Benth & Hook. *Acta Alimentaria* **28**, 291–295.
- Stahl-Biskup, E., & Sáez, F. 2002. Thyme: The Genus *Thymus*. CRC Press.
- Steinberg, M., Holtzapffel, T., & Rautureau, M. 1987. Characterization of overgrowth structures formed around individual clay particles during early diagenesis. *Clays Clay Miner* **35**, 189–195.
- Sterckeman, T., Ouvrard, S., & Leglize, P. 2012. Phytoremédiation des sols. Les techniques de l'ingénieur, BIO5300.
- Stroes-Gascoyne, S., Schippers, A., Schwyn, B., Poulain, S., Sergeant, C., Simonoff, M., Le Marrec, C., Altmann, S., Nagaoka, T., Mauclaire, L., McKenzie, J., Daumas, S., Vinsot, A., Beaucaire, C., & Matray, J.-M. 2007. Microbial community analysis of Opalinus Clay drill core samples from the Mont Terri Underground Research Laboratory, Switzerland. *Geomicrobiology Journal* **24**, 1–17.
- Stumm, W. 1992. Chemistry of the Solid-Water Interface: Processes at the Mineral-Water and Particle-Water Interface in Natural Systems. 1 edition. Wiley-Interscience, New York.
- Subramanian, K.S., & Charest, C. 1998. Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. *Physiologia Plantarum* **102**, 285–296.
- Subramanian, K.S., Charest, C., Dwyer, L.M., & Hamilton, R.I. 1997. Effects of arbuscular mycorrhizae on leaf water potential, sugar content, and P content during drought and recovery of maize. *Canadian Journal of Botany* **75**, 1582–1591.
- Suh, H.-J., Lee, K.-S., Kim, S.-R., Shin, M.-H., Park, S., & Park, S. 2011. Determination of singlet oxygen quenching and protection of biological systems by various extracts from seed of *Rumex crispus* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **102**, 102–107.



- Taylor, B.E., Wheeler, M.C., & Nordstrom, D.K. 1984. Stable isotope geochemistry of acid mine drainage: Experimental oxidation of pyrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **48**, 2669–2678.
- Tekoriene, R., & Loziene, K. 2012. Disinfecting Capacity of Essential Oil of *Thymus Pulegioides* L. (lamiaceae) Chemotypes Against Phytopathogenic *Pseudomonas* Species. *Acta Alimentaria* **41**, 257–264.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Polissiou, M., & Sokmen, A. 2005. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering* **66**, 447–454.
- Thion, C., Cébron, A., Beguiristain, T., & Leyval, C. 2012. PAH biotransformation and sorption by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed co-cultures. *International Biodeterioration & Biodegradation* **68**, 28–35.
- Tian, Y., Liu, C.-H., Smucker, A.J.M., Li, H., & Zhang, W. 2015. Plant Root Exudates Decrease Mobility of Smectite Colloids in Porous Media in Contrast to Humic Acid. *Soil Science Society of America Journal* **79**, 467–475.
- Tinseau, E., Bartier, D., Hassouta, L., Devol-Brown, I., & Stammose, D. 2006. Mineralogical characterization of the Tournemire argillite after in situ interaction with concretes. *Waste Management* **26**, 789–800.
- Toniazzo, V. 1998. Approche des mécanismes d'oxydation de la pyrite par *Thiobacillus ferrooxidans* grâce à la modélisation morpho-chimique de la surface minérale: rôle fondamental des phases superficielles oxydées.
- Topcu, G., Ayril, M.N., Aydin, A., Goren, A.C., Chai, H.B., & Pezzuto, J.M. 2001. Triterpenoids of the roots of *Lavandula stoechas* ssp *stoechas*. *Pharmazie* **56**, 892–895.
- Torma, A.E., & Bosecker, K. 1982. Bacterial leaching. *Progress in Industrial Microbiology* **16**, 77–118.
- Trouvelot, A., Kouch, J., & Gianinazzi-Pearson, V. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'une système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Gianinazzi. Les mycorhizes : Physiologie et Génétique, 1er séminaire Européen sur les mycorhizes, Dijon, INRA, Paris.
- Tsuro, M., Inoue, M., & Kameoka, H. 2001. Variation in essential oil components in regenerated lavender (*Lavandula vera* DC) plants. *Scientia Horticulturae* **88**, 309–317.
- Ubersfeld, D., Leyval, C., Redon, P.-O., & Mustin, C. Antioxidant plant metabolites affect mineral element leaching from Callovo-Oxfordian clays. *European Journal of Soil Science*.
- Ullman, W.J., Kirchman, D.L., Welch, S.A., & Vandevivere, P. 1996. Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. *Chemical Geology* **132**, 11–17.
- Vázquez, B.I., Fente, C., Franco, C.M., Vázquez, M.J., & Cepeda, A. 2001. Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiology* **67**, 157–163.
- Vysochina, G.I. 2010. Flavonoids of the *Chenopodium* L. genus of world flora. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **36**, 787–792.
- Welch, S.A., & Ullman, W.J. 2000. The temperature dependence of bytownite feldspar dissolution in neutral aqueous solutions of inorganic and organic ligands at low temperature (5–35°C). *Chemical Geology* **167**, 337–354.
- Welch, S.A., & Vandevivere, P. 1994. Effect of microbial and other naturally occurring polymers on mineral dissolution. *Geomicrobiology Journal* **12**, 227–238.

- Wenzel, W.W. 2009. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant and Soil* **321**, 385–408.
- West, J.M., & Mckinley, I.G. 2003. Geomicrobiology of radioactive waste disposal. In *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **52**, 487–511.
- Willett, I., Chartres, C., & Nguyen, T. 1988. Migration of Phosphate into Aggregated Particles of Ferrihydrite. *Journal of Soil Science* **39**, 275–282.
- Wilson, M.J. 2004. Weathering of the primary rock-forming minerals: processes, products and rates. *Clay Minerals* **39**, 233–266.
- Wu, L., Jacobson, A.D., & Hausner, M. 2008. Characterization of elemental release during microbe-granite interactions at T=28 degrees C. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **72**, 1076–1095.
- Xia, D.-Z., Yu, X.-F., Zhu, Z.-Y., & Zou, Z.-D. 2011. Antioxidant and antibacterial activity of six edible wild plants (*Sonchus* spp.) in China. *Natural Product Research* **25**, 1893–1901.
- Yadav, R., Arora, P., Kumar, S., & Chaudhury, A. 2010. Perspectives for genetic engineering of poplars for enhanced phytoremediation abilities. *Ecotoxicology* **19**, 1574–1588.
- Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M., Gordon, M.H., & Raneva, V.G. 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry* **64**, 59–66.
- Zhang, X., Borda, M.J., Schoonen, M.A.A., & Strongin, D.R. 2003. Pyrite oxidation inhibition by a cross-linked lipid coating. *Geochemical Transactions* **4**, 8.
- Zhu, X., Li, J., & Wadsworth, M.E. 1994. Characterization of surface layers formed during pyrite oxidation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **93**, 201–210.
- Zijlstra, J.D., Van't Hof, P., Baar, J., Verkley, G.J.M., Summerbell, R.C., Paradi, I., Braakhekke, W.G., & Berendse, F. 2005. Diversity of symbiotic root endophytes of the Helotiales in ericaceous plants and the grass, *Deschampsia flexuosa*. *Studies in Mycology*, 147–162.
- Zollinger, N., Koenig, R., Cerny-Koenig, T., & Kjelgren, R. 2007. Relative salinity tolerance of intermountain western United States native herbaceous perennials. *Hortscience* **42**, 529–534.

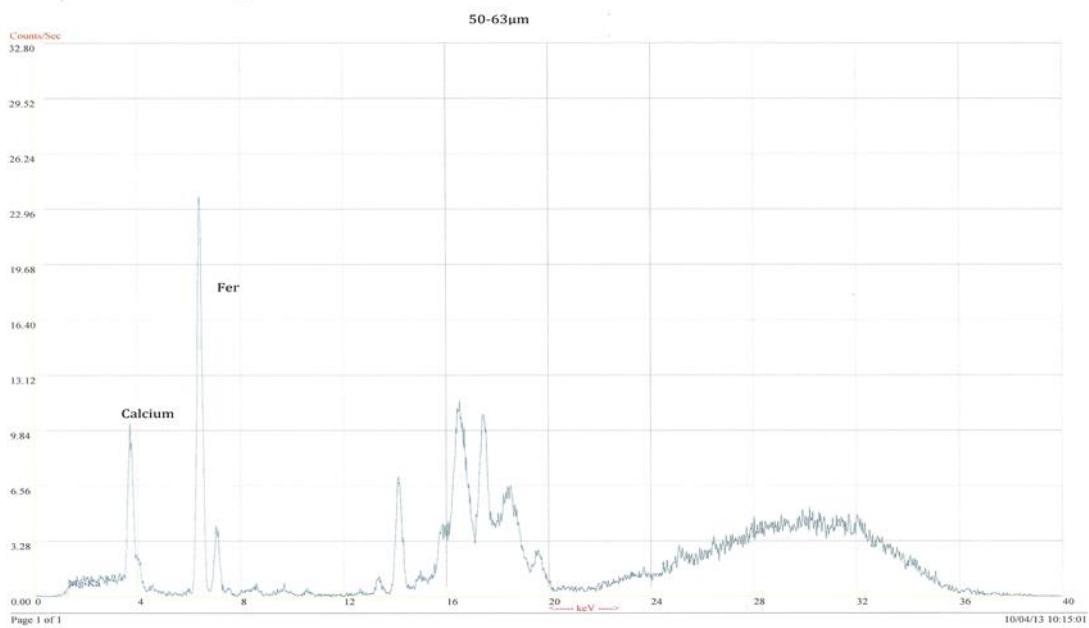
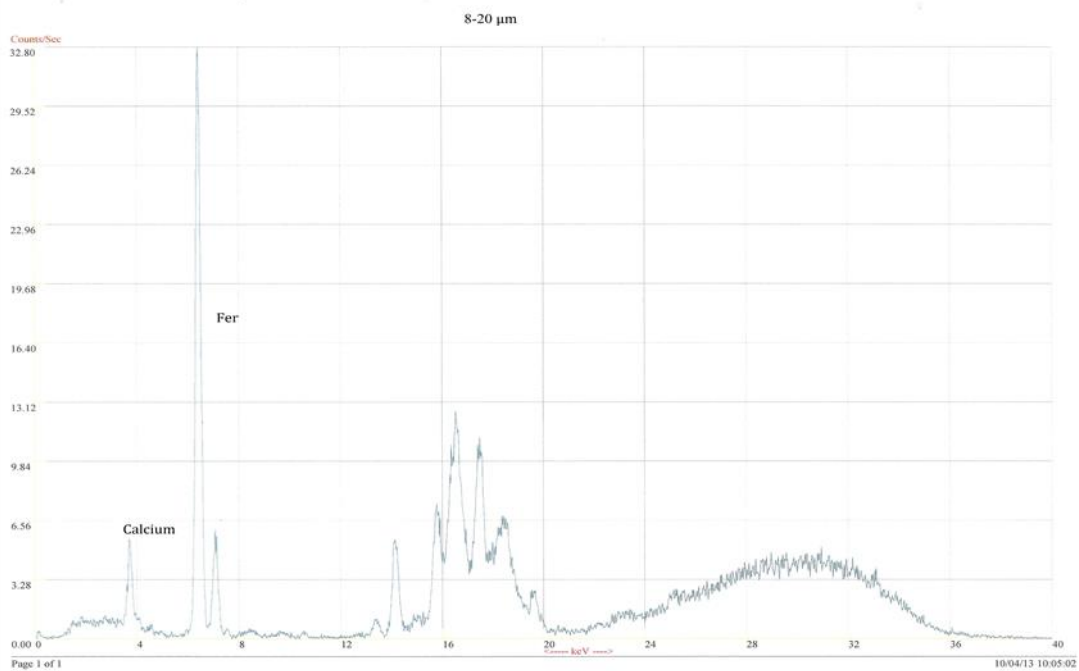
## Annexes

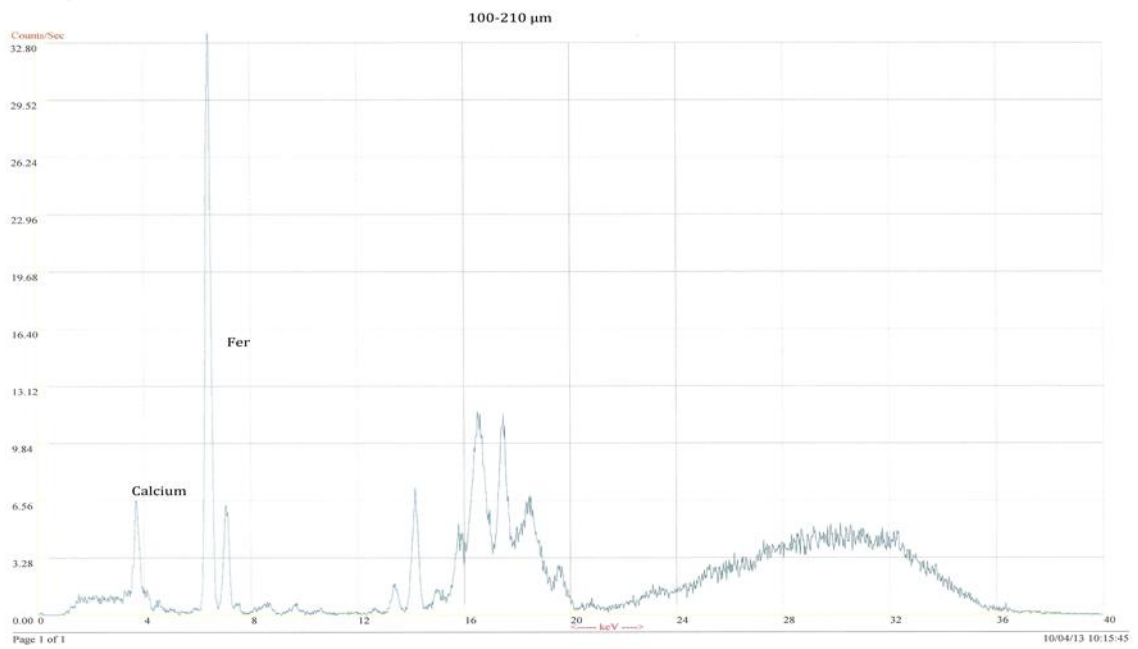
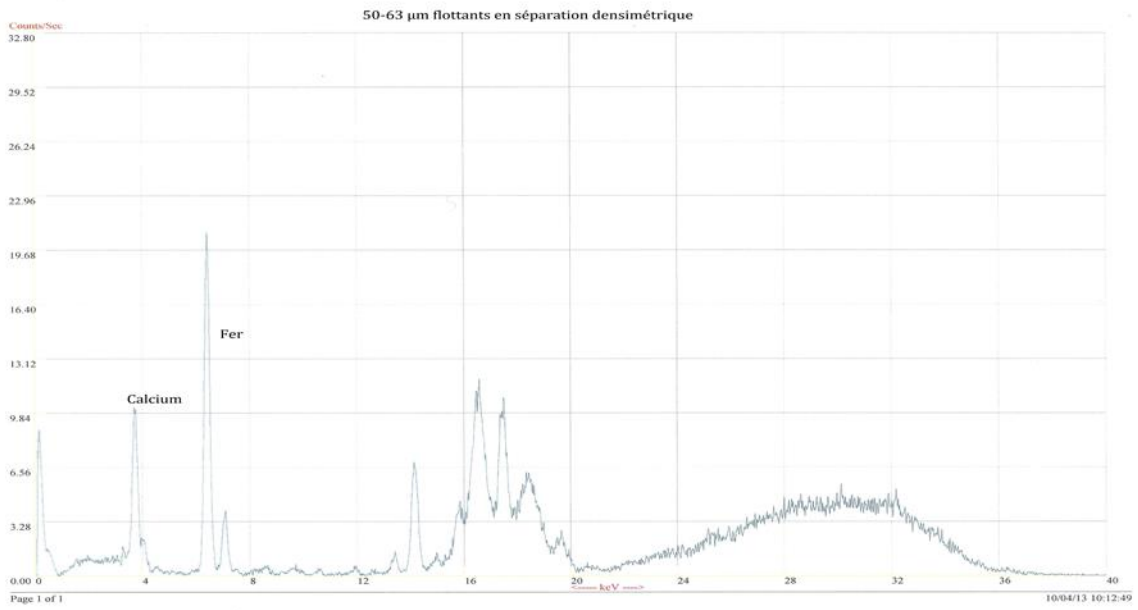
---



**Annexe 1**

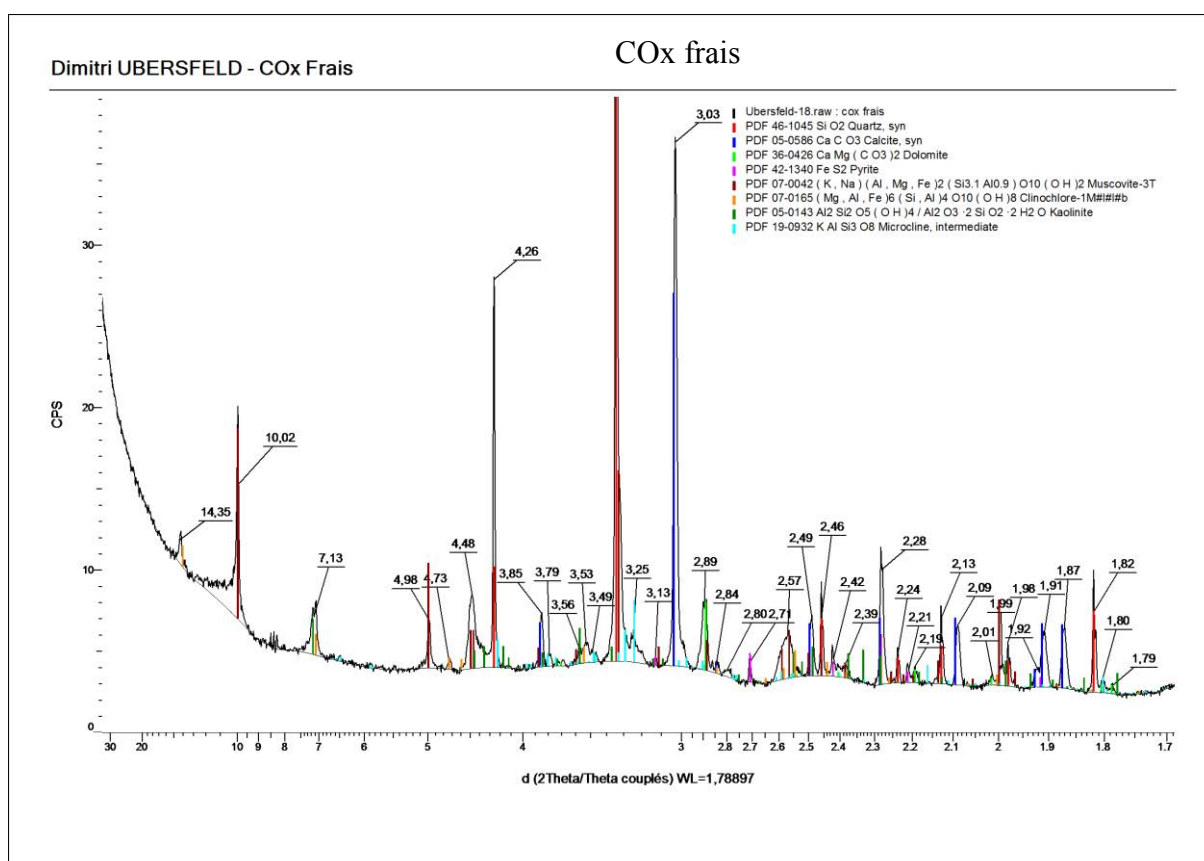
Spectres de fluorescence X du COx frais pour les fractions <8 µm; 8-25 µm; 50-63 µm flottants à l'issue de la densimétrie; 50-63 µm et 100-210 µm.



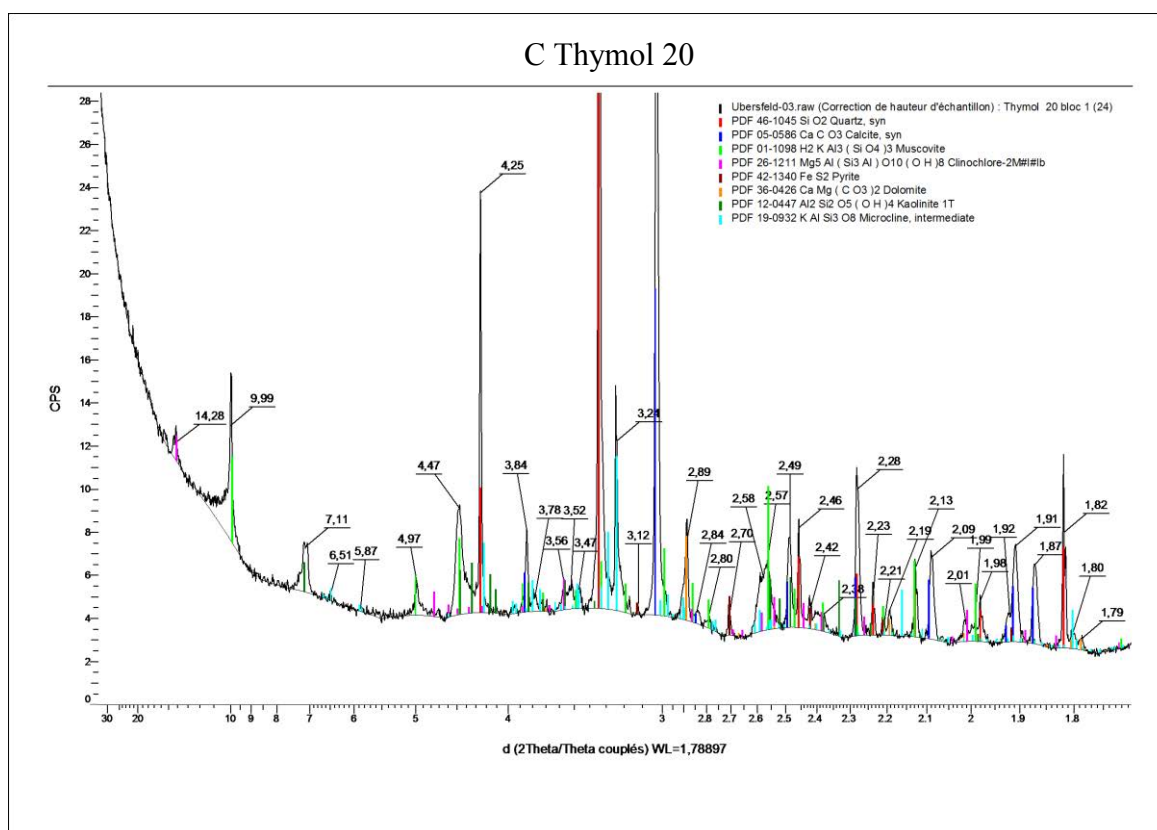
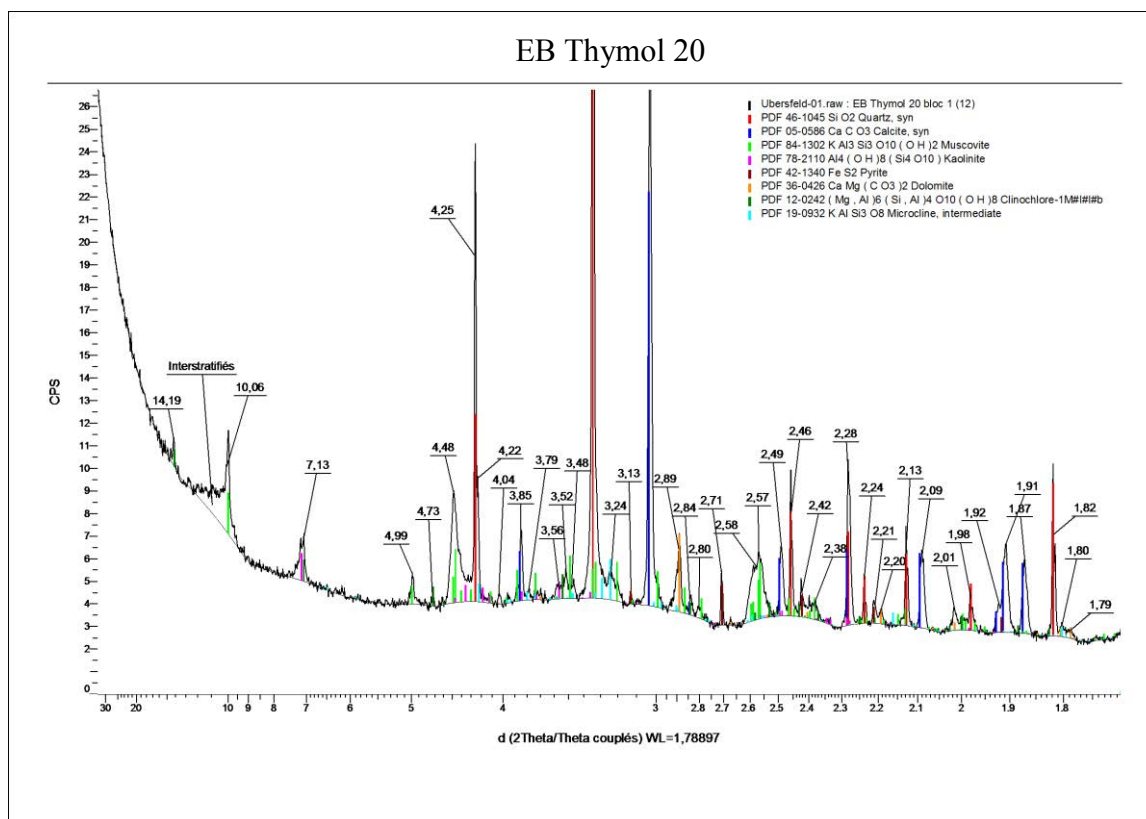


## Annexe 2

Diffractogrammes des échantillons de COx frais, de COx issu de la deuxième expérimentation en laboratoire (Chapitre IV-2) en présence ou non de linalol et thymol à  $20 \text{ mg.l}^{-1}$  amendé avec des exsudats racinaires et bactéries (EB) et et contrôle (C) et de l'expérimentation de suivi de verse végétalisée par le lavandin (Chapitre V-2) (BTRN (bouture terreau racines nues) : planté, TSP (Témoin sans plante) : non planté ; P1 (2 cm) = surface ; P3 (15cm) = profondeur)

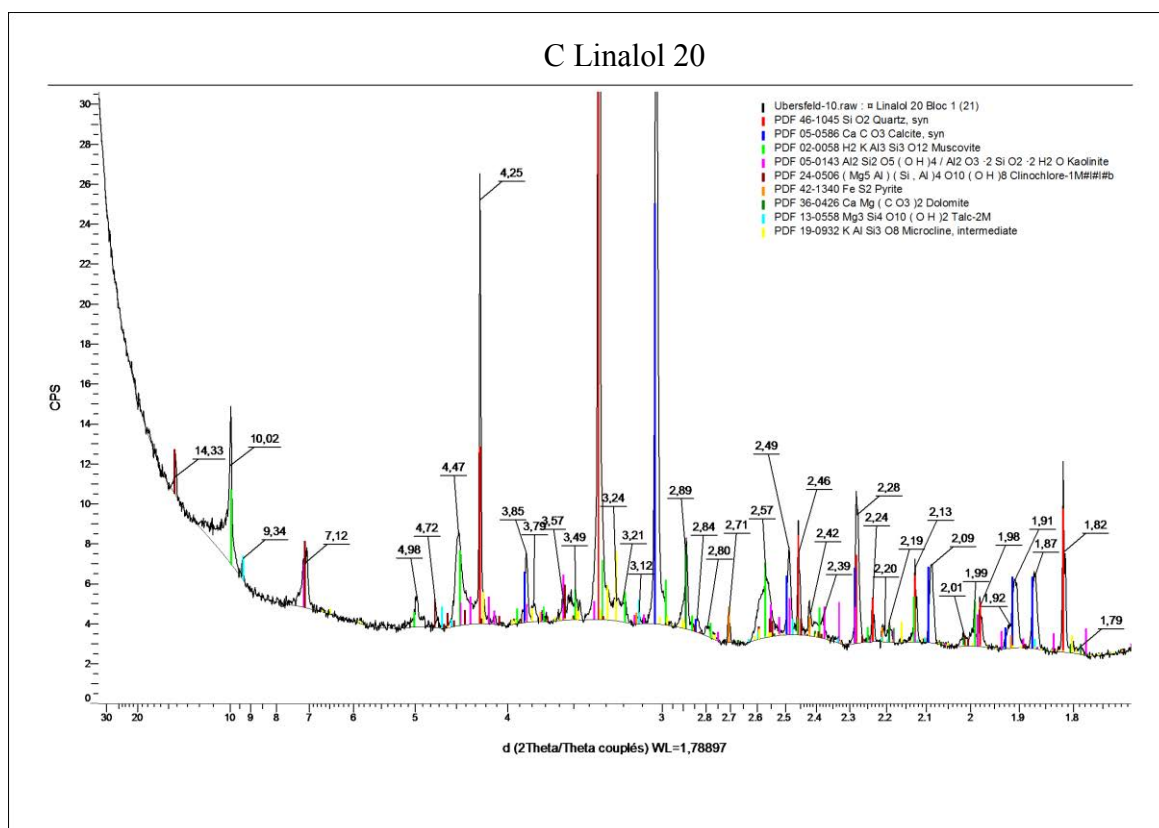
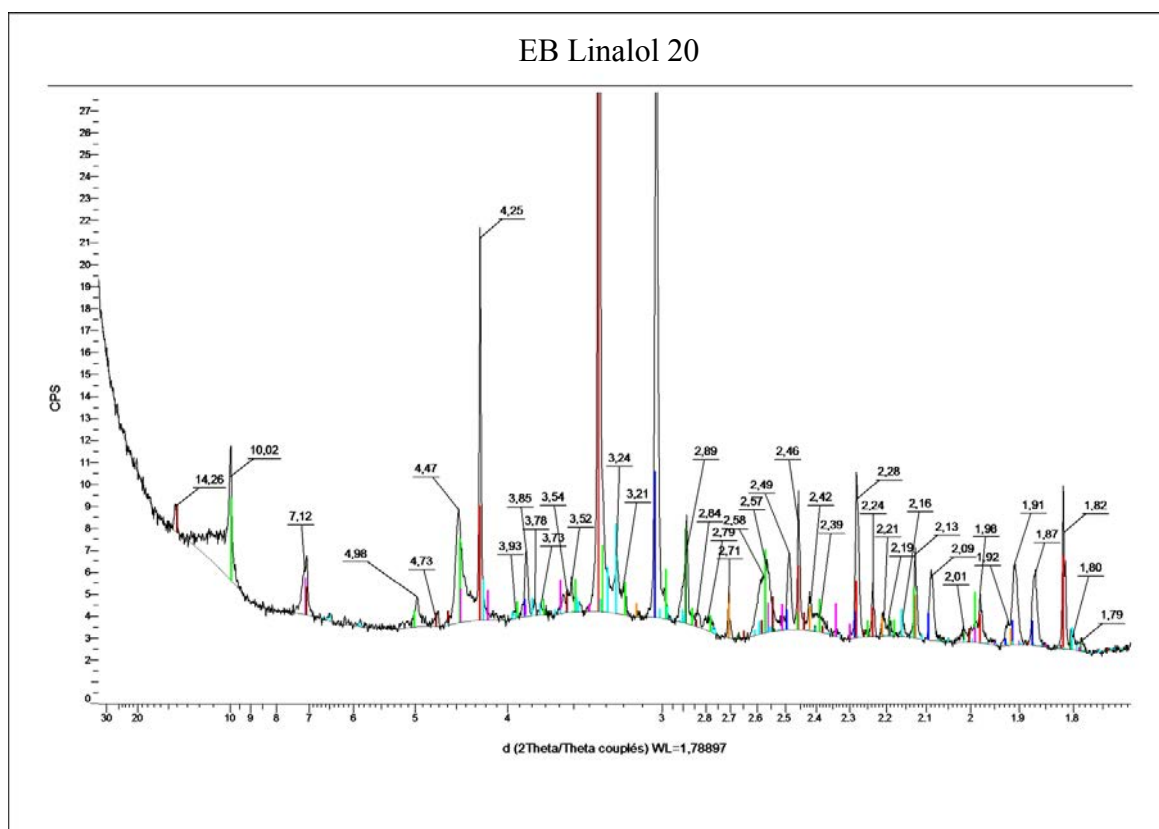


## Expérimentation en laboratoire (Chapitre IV-2)

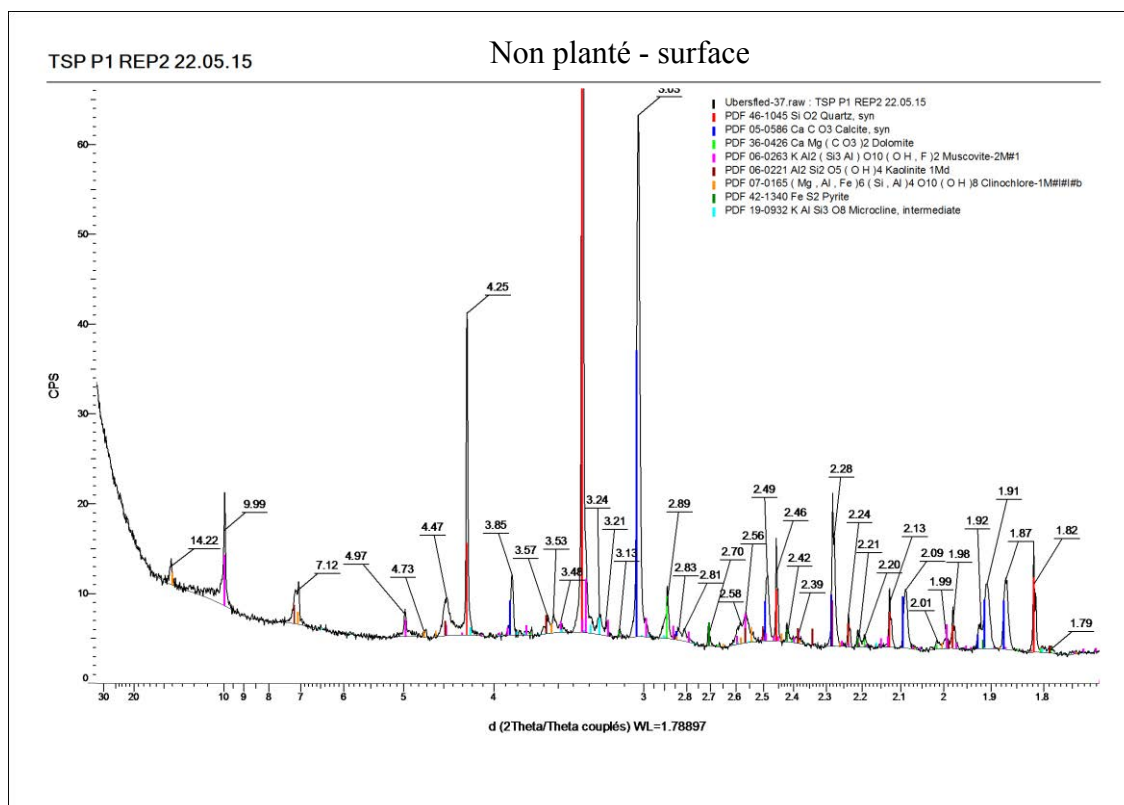
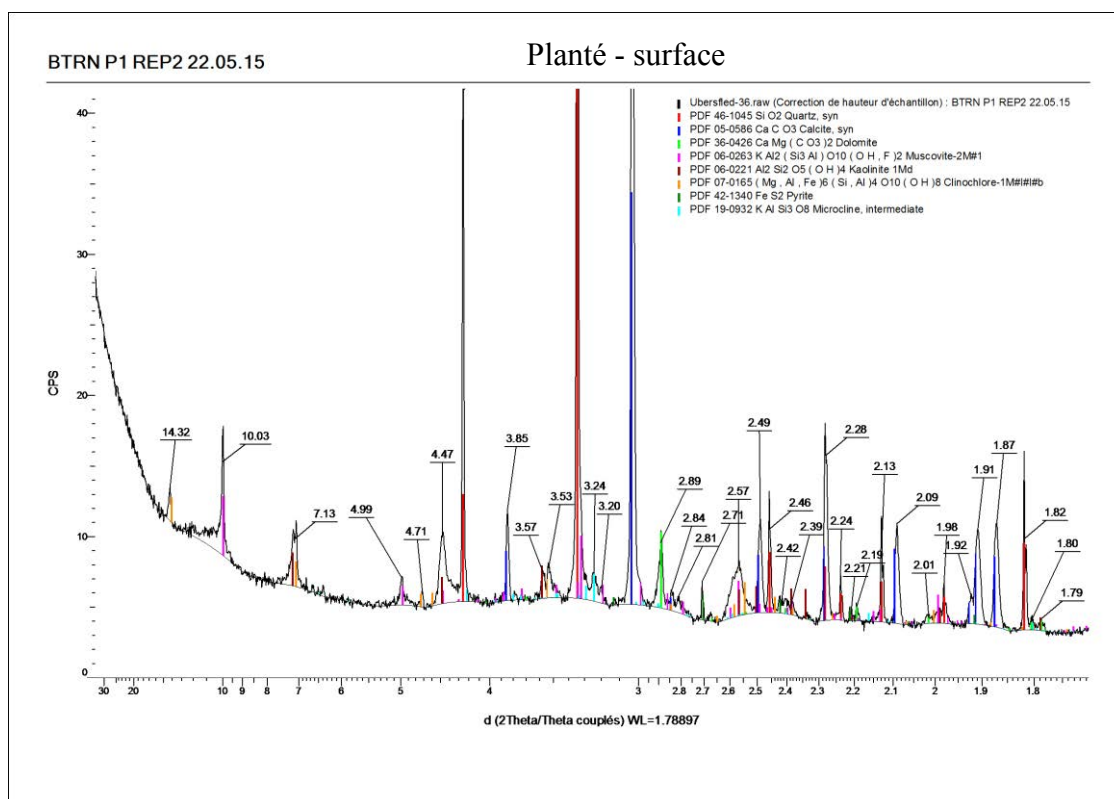




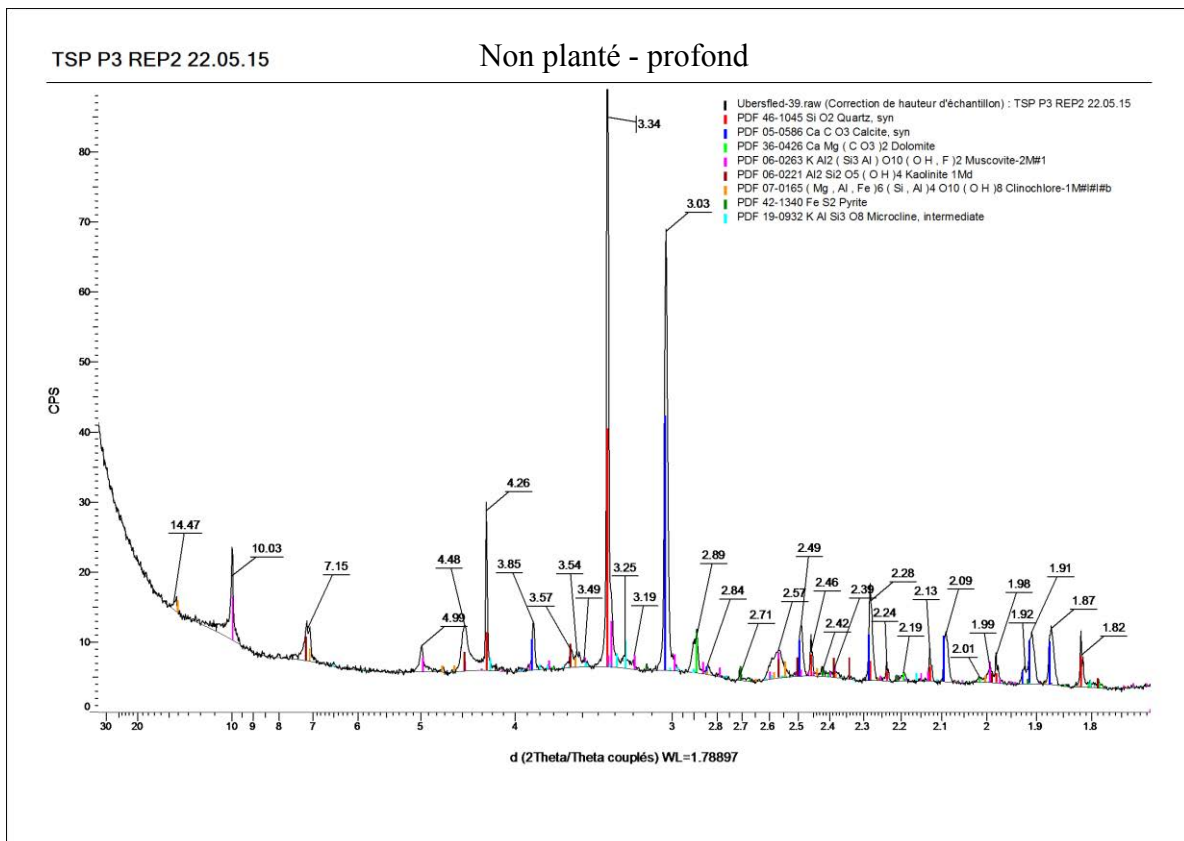
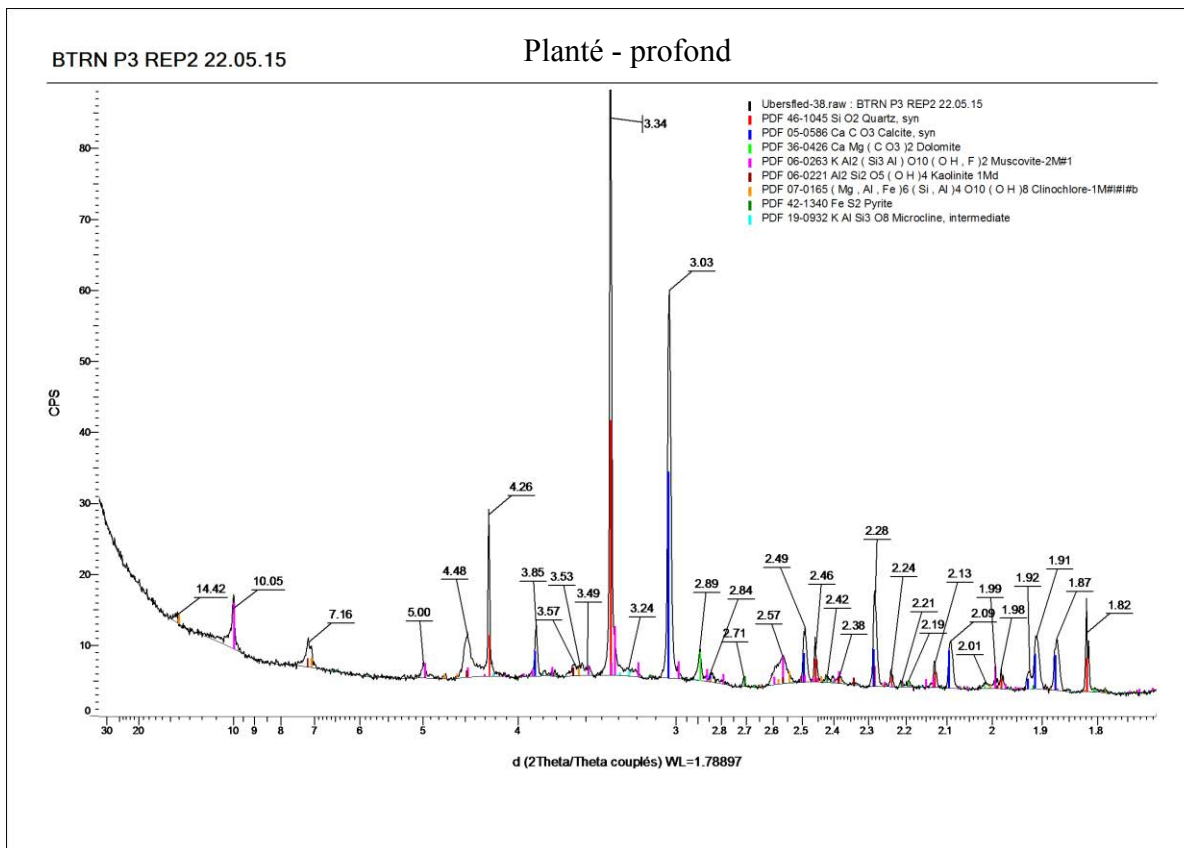
Expérimentation en laboratoire (Chapitre IV-2)



# Expérimentation *in situ* (Chapitre V-2)

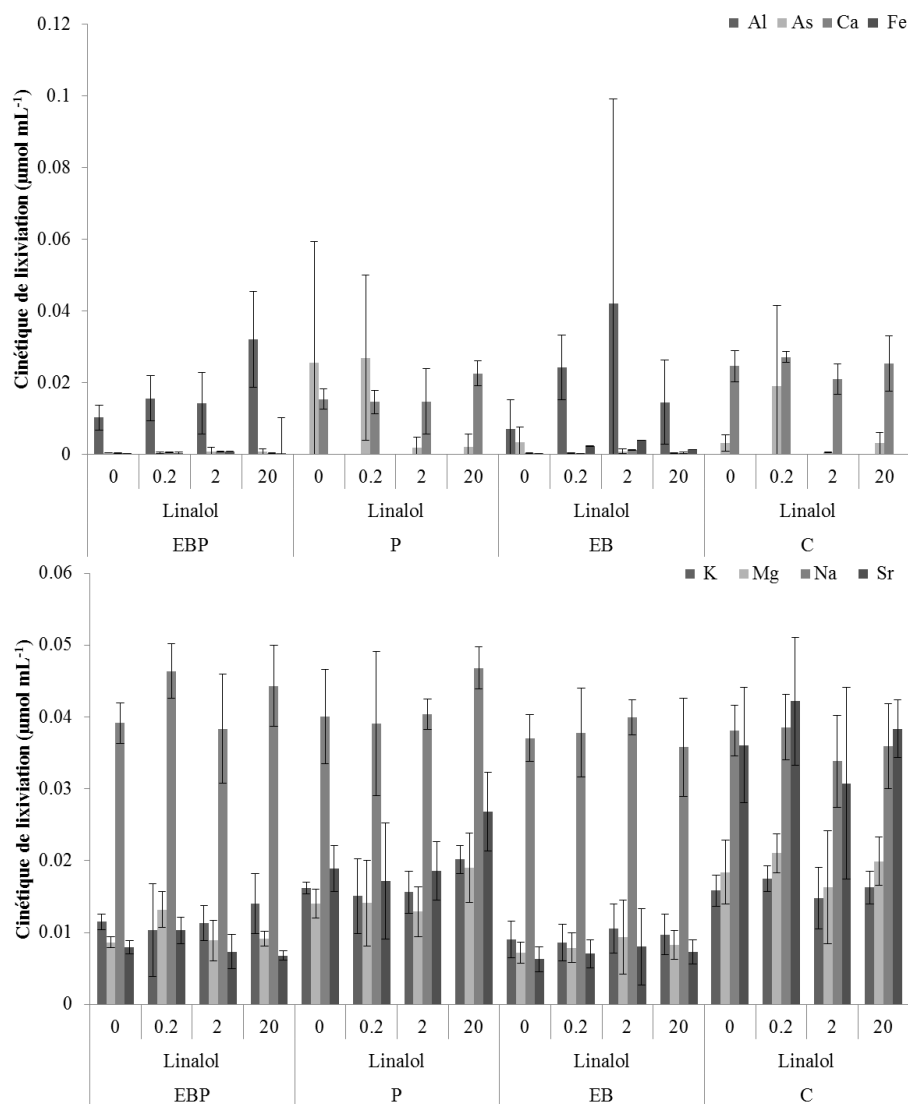


Expérimentation *in situ* (Chapitre V-2)



### Annexe 3

Cinétiques ( $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) et taux de lixiviation (en %) des éléments issus du COx en présence ou non de linalol à 0, 0,2, 2 et 20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  amendé avec des exsudats racinaires et bactéries (EB) et pyrite (EBP), pyrite (P) et contrôle (C) (Chapitre IV-2)

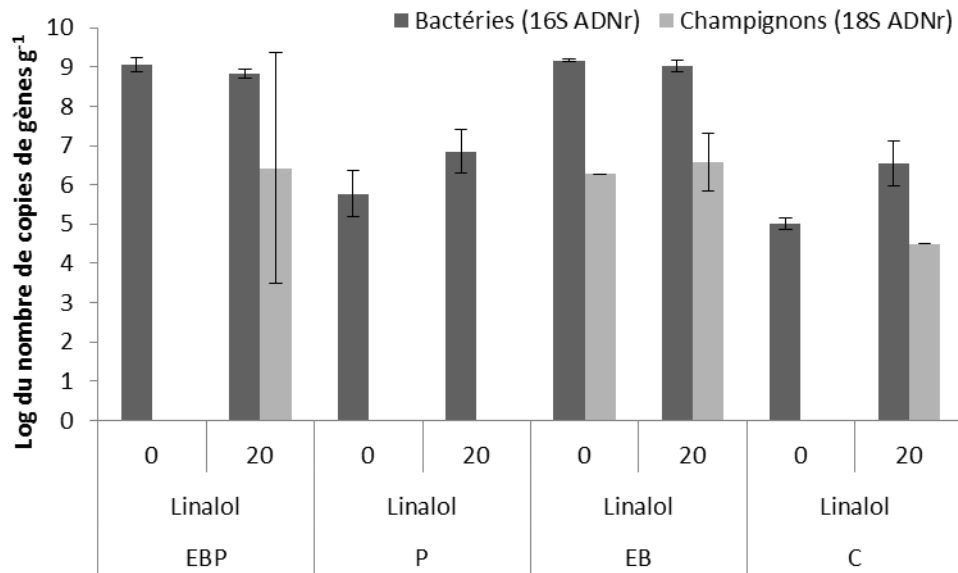


Antioxydant concentration	0	0.2	2	20	Treatment	EBP	P	EB	C
Al	A	A	A	A	Al	A		A	
As	A	A	A	A	As	B	A	B	AB
Ca	A	A	A	A	Ca	C	B	C	A
Fe	A	A	A	A	Fe	A		A	
K	A	A	A	A	K	B	A	B	A
Mg	A	A	A	A	Mg	C	B	C	A
Na	A	A	A	A	Na	A	AB	AB	B
Sr	A	A	A	A	Sr	C	B	C	A

Concentrations en antioxydants		Lixiviation des éléments (%)			
		S	P		
<b>Linalol</b>					
<b>0</b>	<b>EBP</b>	2.04 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.67 ± 0.76 <sup>a</sup>		
	<b>P</b>	3.6 ± 0.2 <sup>b</sup>			
	<b>EB</b>	6.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.08 <sup>a</sup>		
	<b>C</b>	6.6 ± 0.8 <sup>a</sup>			
<b>0.2</b>	<b>EBP</b>	2.0 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.3 ± 0.2 <sup>b</sup>		
	<b>P</b>	4.0 ± 0.8 <sup>b</sup>			
	<b>EB</b>	5.6 ± 0.8 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.3 <sup>a*</sup>		
	<b>C</b>	6.8 ± 0.9 <sup>a</sup>			
<b>2</b>	<b>EBP</b>	7.0 ± 1.2 <sup>a*</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>a</sup>		
	<b>P</b>	3.4 ± 0.3 <sup>b</sup>			
	<b>EB</b>	5.4 ± 0.9 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.8 <sup>a*</sup>		
	<b>C</b>	7.1 ± 0.5 <sup>a</sup>			
<b>20</b>	<b>EBP</b>	1.7 ± 0.5 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.3 <sup>b</sup>		
	<b>P</b>	3.0 ± 0.5 <sup>b*</sup>			
	<b>EB</b>	5.7 ± 1.2 <sup>a</sup>	1.8 ± 1.2 <sup>a*</sup>		
	<b>C</b>	6.4 ± 0.6 <sup>a</sup>			
Concentration en antioxydant		0	0.2	2	20
S		B	B	A	B
P		A	A	A	A
Traitement		EBP	P	EB	C
S		C	C	B	A
P		B	C	A	C

## Annexe 4

Nombre de copies de gènes bactériens et fongiques dans le COx amendé avec des exsudats racinaires et bactéries (EB) et pyrite (EBP), pyrite (P) et contrôle (C) après lixiviation sans ou avec une solution de linalol à 20 mg.l<sup>-1</sup> (Chapitre IV-2)



Concentration en antioxydant		0	20	
16S		A	B	
18S		A	A	
Traitement	EBP	P	EB	C
16S	A	B	A	B
18S	A		A	



**Résumé :** Cette étude s'inscrit dans le contexte du stockage profond de déchets radioactifs sur le site de Meuse-Haute Marne (Andra) et plus précisément de l'évolution bio-physico-chimique de roches sédimentaires argileuses (Callovo-Oxfordien, COx), excavées et stockées en surface sous forme de vers. Durant la phase préparatoire et la phase d'exploitation, plusieurs millions de mètres cubes d'argilites seront excavées. L'argilite stockée à l'air libre sera ainsi exposée durant plusieurs décennies aux altérations météoritiques et aux conditions oxydantes de surface et à la colonisation biologique (plantes, bactéries, champignons). L'objectif de la thèse était d'étudier l'impact de molécules antioxydantes et de la végétalisation des vers par des plantes produisant ces molécules, sur les processus d'altération physiques, chimiques ou microbiens de l'argilite du COx. Ce travail visait à (i) identifier des molécules antioxydantes et des plantes d'intérêt (ii) évaluer les effets inhibiteurs des substances antioxydantes sur l'altération des minéraux et la lixiviation des métaux du COx au laboratoire, (iv) tester la cultivabilité des plantes sélectionnées sur les vers, (iii) suivre in situ l'évolution physico-chimique et microbiologique de l'argilite d'une verse plantée ou non. Des expériences de percolation en colonnes avec des molécules antioxydantes « modèles » des Lamiacées (linalol, thymol, carvacrol) ont montré des taux d'altération/lixiviation très variables en fonction de l'élément. Ils étaient très faibles pour l'aluminium (<1‰), compris entre 1-3% pour les autres métaux (Ca, Mg, Fe...) et atteignaient plus de 60% pour le sodium. Avec le thymol à 20 mg/l ont été observés sur 3 mois une diminution des taux de lixiviation du soufre et des éléments métalliques constitutifs des sulfures (Fe, As) et carbonates (Ca, Sr) et une diminution de l'abondance microbienne bactérienne et fongique. Cependant, l'apport d'exsudats racinaires synthétiques dans les colonnes a stimulé le développement microbien et amélioré la disponibilité de l'aluminium et du fer et la séquestration du calcium. Parmi les plantes testées, la lavande et le lavandin ont été sélectionnées. Deux essais successifs de plantations ont été menés in situ sur une verse d'argilite âgée (10 ans) durant un an. Le lavandin s'est mieux développé que la lavande et a été conservé pour la deuxième étude in situ. La comparaison de la partie plantée de la verse avec la partie nue a montré (i) une diminution significative des quantités de calcium, strontium, fer et soufre lixiviés (ii) une réduction importante de la quantité de matériel érodé (de deux ordres de grandeur) sur le talus planté par rapport au non planté (iii) un développement microbien et un taux de mycorrhization important des racines. En conclusion, même si les molécules antioxydantes n'inhibent pas significativement l'altération de l'argilite, le lavandin s'est révélé une plante tout à fait pertinente pour la phytostabilisation des vers et la production de molécules antioxydantes in situ a été montrée.

**Mots clés :** Argilite, altération, *Lamiaceae*, sulfures, rhizosphère, antioxydants

**Abstract:** This study is a part of the deep disposal site development for radioactive waste in Meuse-Haute Marne (France), most specifically on the bio-physico-chemical conversion of sedimentary clay rocks (Callovo-Oxfordian, COx), excavated and stored on surface in the form of heap. During the experimental and operational phases, several million cubic meters of argillite will be excavated. Argillite stored in the open air will be exposed to meteoritic alterations, oxidizing conditions of surface and colonized biologically (plants, bacteria, fungi). The aim of the thesis is to study the impact of naturally derived antioxidants from revegetation of heap with antioxidant-producing plants on the physical, chemical or microbial weathering processes of argillite. This work was designed to (i) identify suitable naturally derived antioxidants and the plants to produce them (ii) assess the antioxidant inhibitory effects on weathering and leaching COx metals in the laboratory, (iv) field test selected plants on the heap, (iii) follow in situ physicochemical and microbiological evolution of the argillite heap planted with antioxidant producing plants. In the laboratory, percolating model antioxidants of Lamiaceae (linalool, thymol, carvacrol) through a packed column of argillite showed variable water weathering/leaching rate depending on the metal elements present; very low for aluminum (<1 ‰), between 1-3% for other metals (Ca, Mg, Fe ...) and reach more than 60% for sodium. With thymol at 20 mg/l for 3 months, it was found that there are a decrease in sulfur leached amount and the metal elements from the sulfides (Fe, As) and carbonates (Ca, Sr) and inhibition of bacterial and fungal microflora growths. However, intake of artificial root exudates in columns stimulates microbial growth, improves the availability of aluminum, iron and provides sequestration of calcium. Among the tested plants, lavender and lavandin were selected. Two successive plantation tests were carried out in situ on a heap of old argillite (10 years) for one year. The lavandin grew better than lavender and was retained for the second study in situ. The comparison of the planted part of the COx heap with bare COx showed (i) a significant reduction in the quantities of calcium, strontium, iron and sulfur leached (ii) a significant reduction (by two orders of magnitude) to the amount of eroded material on the slope planted compared to unplanted (iii) a significant rate of mycorrhiza roots and microbial growth. In conclusion, although the naturally derived antioxidants did not significantly inhibit the alteration of argillite, the lavandin is an excellent plant for phytostabilisation of heap and for production of antioxidants.

**Key words :** Argillite, alteration, *Lamiaceae*, sulfides, rhizosphere, antioxidants