



Impact des exsudats racinaires de *Miscanthus x giganteus* sur les microorganismes impliqués dans la bioremédiation d'un sol contaminé au benzo(a)anthracène

Mélanie Mazziotti

► To cite this version:

Mélanie Mazziotti. Impact des exsudats racinaires de *Miscanthus x giganteus* sur les microorganismes impliqués dans la bioremédiation d'un sol contaminé au benzo(a)anthracène. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0046 . tel-01553359

HAL Id: tel-01553359

<https://theses.hal.science/tel-01553359>

Submitted on 3 Jul 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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université de Lorraine, Collegium Sciences et Technologies
Ecole Doctorale RP2E «Ressources, Procédés, Produits, Environnement»

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine
mention " Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes"

Par Mélanie MAZZIOTTI

**Impact des exsudats racinaires de *Miscanthus x giganteus* sur les
microorganismes impliqués dans la bioremédiation d'un sol
contaminé au benzo(a)anthracène**

le 03 mai 2017

Membres du jury :

M. Christophe BERTSCH <i>Professeur, Université de Haute-Alsace, Mulhouse</i>	Rapporteur
M. Fabrice MARTIN-LAURENT <i>Directeur de recherche, INRA, Agroécologie, Dijon</i>	Rapporteur
M. Patrick CHARBONNIER <i>Docteur-Ingénieur, Arcelor Mittal, Luxembourg</i>	Examineur
M. Philippe LAVAL-GILLY <i>Maître de conférences HDR, Université de Lorraine, Thionville-Yutz</i>	Examineur
M. Jairo FALLA <i>Professeur, Université de Lorraine, Thionville-Yutz</i>	Directeur de thèse
Mme Sonia HENRY <i>Maître de conférences, Université de Lorraine, Thionville-Yutz</i>	Co-directrice de thèse

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux
UMR 7360 CNRS – Université de Lorraine
IUT de Thionville-Yutz - Espace Cormontaigne, F-57970 THIONVILLE-YUTZ

Remerciements

Premièrement, je tiens à remercier tous les membres du jury, M. Christophe Bertsch, M. Fabrice Martin-Laurent, M. Patrick Charbonnier et M. Philippe Laval-Gilly d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Ensuite, je souhaiterais remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, Jaïro Falla, et ma co-directrice de thèse, Sonia Henry, pour leur accompagnement tout au long de ce travail. Merci pour votre aide et vos précieux conseils que vous avez su m'apporter pendant ces quatre années. Merci également à Philippe Laval-Gilly pour toutes ses suggestions durant la thèse et lors de la rédaction du manuscrit.

Je tiens aussi à remercier la Communauté d'agglomérations Porte de France – Thionville pour son aide financière.

Merci à Antoine Bonnefoy pour sa formation et son aide technique. Merci également à Clément Bojic de m'avoir fourni des algues et à Adrien Dehyèvre pour son aide lors de la préparation des lames d'observations de racines de *Vicia faba*.

Je voudrais aussi remercier tous les étudiants qui m'ont aidé lors des différentes analyses. De ce fait, je remercie les élèves du projet tutoré : Pauline Magne, Cynthia Meyer, Cindy Moll, Maxime Odinot, Jordan Ornielli, Olivier Petitjean, Lisa Poirson et Hadjara Saindou, ainsi que les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer : Julie Bonnefoy, Amandine Briand, Amélie Rondu et Laura Wechtler. Merci à vous pour votre aide et votre sympathie.

Je remercie également les stagiaires : Firmin, Benjamin, Maureen, Pierre-Marie, Mamadou et Jimmy, avec qui j'ai partagé mon bureau, pour leur compagnie et leur bonne humeur. Un énorme merci à Johanne Cennerazzo et Amina Daoud avec qui j'ai débuté ma toute première année de thèse. Merci pour cette grande amitié, merci pour tout ! Je n'ai qu'une chose à dire : 🐪 heueueueueu !!

Je tiens particulièrement à remercier Nicolas Abar et Louise Walderdorff, mes collègues et amis thésards. Merci d'avoir brisé ma solitude !! Merci pour vos conseils, votre bonne humeur et tous les fous rires que nous avons pu avoir ! Je vous souhaite beaucoup de courage !!

Une pensée aussi à mes prédécesseurs : Nicolas Couleau, Claudia Martinez-Chois et Didier Técher, pour qui je l'espère, tout se passe pour le mieux.

Enfin, de façon plus personnelle, je souhaiterais remercier mes amies : Maïté (ma best), Sarah (ma catin), Cindy (mon graben), Emilie, Laura et Delphine (mes josianes) et encore une fois Johanne et Amina (mes jmls, mes sommets) pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de cette thèse. Un grand merci également à ma famille, mais surtout à mes parents, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci aussi à ma belle-famille et à Jérémy, mon compagnon, de m'avoir soutenu pendant toutes ces années. Merci pour tout !

Sommaire

Sommaire	1
Liste des figures	3
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations	13
INTRODUCTION GENERALE	16
1. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	19
1.1. Le sol	19
1.1.1. Composition	19
1.1.2. Fonctions	29
1.1.3. Protection	30
1.2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques	31
1.2.1. Caractéristiques.....	31
1.2.2. Origine dans l'environnement.....	35
1.2.3. Toxicité	41
1.2.4. Les caractéristiques du benzo(a)anthracène	45
1.3. Devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les sols	48
1.3.1. Transport et séquestration	48
1.3.2. Biodisponibilité.....	51
1.3.3. Dissipation	54
1.3.4. La dégradation du benzo(a)anthracène	71
1.4. Les méthodes de dépollution des sols	76
1.4.1. Généralités	76
1.4.2. Biostimulation	81
1.4.3. Bioaugmentation.....	84
1.4.4. Phytoremédiation.....	89
1.5. <i>Miscanthus x giganteus</i>	97
1.5.1. Présentation	97
1.5.2. Culture	99
1.5.3. Productivité	104
1.5.4. Valorisation	105
1.5.5. Phyto/rhizoremédiation	106

1.6.	Objectifs de la thèse	107
2.	MATERIELS ET METHODES.....	111
2.1.	Expérience de phyto/rhizoremédiation	111
2.1.1.	Mise en place.....	111
2.1.2.	Analyses.....	114
2.2.	Expérience de bioaugmentation/biostimulation	138
2.2.1.	Mise en place.....	138
2.2.2.	Analyses.....	144
2.3.	Analyses statistiques	147
3.	RESULTATS ET DISCUSSION	150
3.1.	Expérience de phyto/rhizoremédiation	150
3.1.1.	Evaluation du développement de la plante	150
3.1.2.	Comparaison des deux méthodes d'extraction d'ADN	152
3.1.3.	Evaluation de la microflore des sols.....	163
3.1.4.	Evaluation de la dissipation du benzo(a)anthracène	175
3.1.5.	Evaluation de la toxicité des sols.....	183
3.1.6.	Conclusion générale	190
3.2.	Expérience de bioaugmentation/biostimulation	192
3.2.1.	Sélection du consortium bactérien	192
3.2.2.	Evaluation de la microflore des sols.....	196
3.2.3.	Evaluation de la dissipation du benzo(a)anthracène	222
3.2.4.	Evaluation de la toxicité des sols.....	231
3.2.5.	Conclusion générale	233
4.	CONCLUSION GENERALE	237
5.	REFERENCES.....	240
6.	ANNEXES	295
	Annexe 1. Gel TTGE réalisé à partir des réplicats 2 des échantillons d'ADN provenant de l'expérience de phyto/rhizoremédiation	295
	Annexe 2. Composition du milieu de culture Super Optimal Broth (SOC)	295
	Annexe 3. Préparation des boîtes LB/Ampicilline/IPTG/X-Gal	296
	Annexe 4. Composition du milieu Bushnell-Haas.....	296
	Annexe 5. Composition du milieu de Hoagland	296

Liste des figures

Figure 1. Proportion des principaux composants du sol en volume (White, 2006).	20
Figure 2. Triangle des textures issu de la carte pédologique de l'Aisne (Calvet, 2003a).	21
Figure 3. Caractéristiques principales des substances humiques (Rutkowska and Pikula, 2013).....	23
Figure 4. Proportions approximatives en masse des constituants organiques dans des sols cultivés (Van-Camp <i>et al.</i> , 2004).	24
Figure 5. Déterminisme de la composition de la solution du sol (Calvet, 2013).	26
Figure 6. Déterminisme de la composition de la phase gazeuse du sol (Calvet, 2013).....	28
Figure 7. Arrangements moléculaires possibles des HAP.	31
Figure 8. Exemple de HAP alternant et non alternant.	34
Figure 9. Mécanisme de pyrosynthèse des HAP à partir de l'éthane (Ravindra <i>et al.</i> , 2008). ..	36
Figure 10. Processus de dépôt des polluants (Dahnoun, 2013).	41
Figure 11. Emission de HAP dans l'atmosphère en France métropolitaine par secteur (en t), en 2013 (CITEPA, 2016).	41
Figure 12. Illustration des régions baie et fjord chez le benzo(a)pyrène et le dibenzo(al)pyrène respectivement.	43
Figure 13. Structure des diastéréoisomères issus du BaA-trans-3,4-dihydrodiol lui même issu du BaA.	47
Figure 14. Processus influençant le devenir des polluants dans les sols (Maes <i>et al.</i> , 2006). ..	48
Figure 15. Séquestration des HAP dans le sol.....	50
Figure 16. Changement de la biodisponibilité des composés organiques avec l'augmentation du temps de contact entre le composé et le sol (Riding <i>et al.</i> , 2013).	51
Figure 17. Influence de la plante, des microorganismes ainsi que des caractéristiques physico-chimiques du polluant et du sol sur la biodisponibilité des polluants organiques (Wenzel, 2009).	52
Figure 18. Voie anaérobie de dégradation du naphthalène en conditions sulfato-réductrices (Annweiler <i>et al.</i> , 2002).....	57

Figure 19. Les trois principales voies de dégradation des HAP par les bactéries et les champignons (Bamforth and Singleton, 2005).	57
Figure 20. Structure moléculaire d'une lignine (Wertz, 2010).	62
Figure 21. Représentation d'une coupe racinaire montrant la structure de la rhizosphère (McNear Jr., 2013).	64
Figure 22. Origines des rhizodépôts (adapté de Dennis <i>et al.</i> , 2010).	66
Figure 23. Similarité structurale entre les composés racinaires et les polluants organiques (Shaw <i>et al.</i> , 2006).	68
Figure 24. Voies de dégradation du benzo(a)anthracène proposées à partir des métabolites identifiés du tableau 14. Les chiffres correspondent aux noms des métabolites du tableau 14 et les points d'interrogation aux métabolites intermédiaires non identifiés.	75
Figure 25. Quantité de sols pollués traités en tonnes par différentes techniques de dépollution en France en 2012 (Cadière, 2012). HS : hors site.	80
Figure 26. Les différents mécanismes de la phytoremédiation (Truu <i>et al.</i> , 2015).	89
Figure 27. Systèmes racinaires fibreux et pivotants (Herren, 2011).	95
Figure 28. Distribution des différentes espèces de <i>Miscanthus</i> dans le monde. Seules les zones de distribution majeures sont représentées (Hodkinson <i>et al.</i> , 2002).	98
Figure 29. Calendrier des programmes clés dans l'investigation de <i>Miscanthus</i> en tant que plante bioénergétique (Heaton <i>et al.</i> , 2010).	99
Figure 30. Cycle annuel typique de croissance de MxG (Heaton <i>et al.</i> , 2010).	101
Figure 31. Gammes de rendements de biomasse obtenus pour MxG au cours d'essais en Europe et aux Etats Unis (Heaton <i>et al.</i> , 2010).	105
Figure 32. Voies de transformation de la biomasse de <i>Miscanthus</i> et leurs produits (Nsanganwimana <i>et al.</i> , 2014).	106
Figure 33. Influence de MxG sur le devenir et le comportement du BaA.	109
Figure 34. Préparation des rhizomes de MxG.	111
Figure 35. Conditions de plantation de MxG.	112
Figure 36. Paramètres analysés lors de l'expérience de phyto/rhizoremédiation.	113
Figure 37. Représentation d'un plant de MxG (Vandendriessche, 2007).	115

Figure 38. Principe de la TTGE.	118
Figure 39. Principe de la qPCR avec du SYBR Green (Smith and Osborn, 2009).	121
Figure 40. Principe du clonage d'un gène d'intérêt (http://genet.univ-tours.fr/gen001300_fichiers/CHAP5D/GEN05D1EC35A.HTM).	122
Figure 41. Photos des milieux de culture de certains microorganismes isolés de l'expérience de rhizoremédiation. En A. sont représentés à droite les deux milieux de culture des consortia dont la couleur a bruni. La photo B. représente le champignon.	129
Figure 42. Spectre d'absorption du BaA.	134
Figure 43. Micronoyaux montrés par les flèches dans les cellules des extrémités radiculaires de <i>Vicia faba</i> (x 400) (NF T 90-327, 2004).	137
Figure 44. Différentes combinaisons testées pour l'expérience de bioaugmentation/biostimulation.	142
Figure 45. Temps de prélèvement et analyses effectuées pour l'expérience de bioaugmentation/biostimulation.	143
Figure 46. Evaluation de la croissance des plants de MxG au cours du temps (de T3 à T12) dans les sols non pollué (SNC) et pollué (SC) par mesures de la hauteur, du nombre de nœuds et du diamètre de la tige (moyenne, n=2 jusqu'à T6 puis n=1).	151
Figure 47. Evaluation de la physiologie des plants de MxG au cours du temps (de T3 à T12) dans les sols non pollué (SNC) et pollué (SC) par mesure de sa chlorophylle totale (moyenne, n=2 jusqu'à T6 puis n=1).	152
Figure 48. Dendrogrammes réalisés par la méthode UPGMA à partir de la présence/absence de phylotypes sur les gels TTGE obtenus par amplification (PCR) du gène ARNr 16S à partir d'extraits d'ADN des deux méthodes d'extraction (méthode 1 et méthode 2). La figure A présente le dendrogramme obtenu à partir des échantillons du sol non contaminé aux différents temps de prélèvement (de T0 à T12) en présence (P) ou non de plante (NP) et la figure B celui obtenu à partir des échantillons du sol contaminé.	161
Figure 49. Nombre de copie du gène ARNr 16S (moyenne ± écart type, n=6) déterminé par qPCR à partir de l'ADN des deux méthodes d'extraction (méthode 1 et méthode 2) dans le sol non pollué (A) et pollué (B) au cours du temps (de T0 à T12) en présence (P) ou non de plante (NP). L'astérisque représente une différence significative entre les deux méthodes d'extraction d'ADN pour les prélèvements de chaque type de sol ($p < 0,05$).	162
Figure 50. Analyse de nMDS réalisée à partir d'une matrice de dissimilarité générée par la présence/absence de phylotypes sur les gels TTGE obtenus par amplification (PCR) du gène ARNr 16S. Les analyses de TTGE ont été effectuées pour chaque réplicat à partir des extraits	

d'ADN des sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) plantés ou non, aux différents temps de prélèvement (T0, T6 et T12). Stress : 0,0731. 165

Figure 51. Nombre de gènes ARNr 16S (moyenne $\pm$ écart type, n=6) présents dans les sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) en présence de plante ou non au cours du temps (de T0 à T12). L'astérisque orange représente une différence significative entre le sol non contaminé et contaminé pour chaque prélèvement ($p < 0,05$). L'astérisque noir représente une différence significative entre le sol planté et non planté du sol contaminé à T6 et T12 ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T6 et T12 pour le sol contaminé planté (vertes, $p < 0,05$) ou non planté (bleues, $p < 0,05$). 167

Figure 52. Nombre de gènes ARNr 18S (moyenne $\pm$ écart type, n=6) présents dans les sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) en présence de plante ou non au cours du temps (de T0 à T12). L'astérisque orange représente une différence significative entre le sol non contaminé et contaminé pour chaque prélèvement ($p < 0,05$). L'astérisque noir ou gris représente une différence significative entre le sol planté et non planté du sol contaminé ou non contaminé respectivement, à T6 et T12 ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T6 et T12 pour le sol contaminé planté (vertes, $p < 0,05$) ou non planté (bleues, $p < 0,05$). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre T0, T6 et T12 pour le sol non contaminé planté (vertes, $p < 0,05$) ou non planté (bleues, $p < 0,05$). 169

Figure 53. Nombre de gènes PAH-RHD $_{\alpha}$ GP (moyenne $\pm$ écart type, n=6) présents dans les sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) en présence de plante ou non au cours du temps (de T0 à T12). L'astérisque orange représente une différence significative entre le sol non contaminé et contaminé pour chaque prélèvement ($p < 0,05$). L'astérisque noir ou gris représente une différence significative entre le sol planté et non planté du sol contaminé ou non contaminé respectivement, à T6 et T12 ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T6 et T12 pour le sol contaminé planté (vertes, $p < 0,05$) ou non planté (bleues, $p < 0,05$). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre T0, T6 et T12 pour le sol non contaminé planté (vertes, $p < 0,05$) ou non planté (bleues, $p < 0,05$). 172

Figure 54. Pourcentage de BaA total récupéré (moyenne $\pm$ écart type, n=3) au cours du temps (de T0 à T12) dans les sols planté et non planté. Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre les différents prélèvements pour chaque type de sol ($p < 0,05$). L'astérisque représente une différence significative entre les sols planté et non planté à T6 et T12 ($p < 0,05$). 178

Figure 55. Pourcentage de BaA récupéré (moyenne $\pm$ écart type, n=3) dans les différentes fractions du sol au cours du temps (de T0 à T12) dans le sol planté (A) et non planté (B). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre les différentes fractions d'un prélèvement pour les deux types de sol ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre les différents prélèvements d'une même fraction pour chaque type de sol ($p < 0,05$). L'astérisque représente une différence

significative entre les prélèvements de chaque type de sol au niveau du total des fractions ($p < 0,05$). 182

Figure 56. Pourcentage d'émergence de graines d'orge (moyenne $\pm$ écart type, $n=4$) exposées pendant 4 jours dans les sols non pollué (sol SNC) et pollué (sol SC) en présence de la plante (P) au cours du temps (de T0 à T12). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre les deux types de sol à chaque prélèvement ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre les différents prélèvements pour chaque type de sol ($p < 0,05$). 187

Figure 57. Biomasse des pousses sèches d'orge (moyenne $\pm$ écart type, $n=4$) exposées pendant 14 jours après l'émergence des graines dans les sol non pollué (SNC) et pollué (SC) plantés (P) au cours du temps (de T0 à T12, A), et dans les sols non pollué (SNC) et pollué (SC) à T12 en présence ou non de la plante (B). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre les différents prélèvements pour chaque type de sol ($p < 0,05$, A). L'astérisque représente une différence significative entre le sol planté et non planté pour chaque type de sol ($p < 0,05$, B). 188

Figure 58. Nombre de micronoyaux pour 1000 cellules dans les racines secondaires de *Vicia faba* (moyenne $\pm$ écart type, $n=2$ lames $\times$ 6 individus) après 37 h d'exposition dans les sols plantés (P) contaminé (SC) ou non (SNC) au cours du temps (de T0 à T12). Tous les échantillons sont significativement différents du témoin positif ($p < 0,05$). L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin négatif ($p < 0,05$). 189

Figure 59. Croissance bactérienne au cours du temps (5 semaines) des deux consortia (C1 et C2) dans du milieu Bushnell-Haas contaminé au BaA en association ou non avec le champignon (CH) ainsi qu'en présence ou non des deux mélanges d'exsudats racinaires (E1 et E2). 194

Figure 60. Pourcentage de BaA total récupéré au cours du temps (5 semaines) dans les milieux Bushnell-Haas contenant les consortia (C1 et C2) en association ou non avec le champignon (CH) ainsi qu'en présence ou non des deux mélanges d'exsudats racinaires (E1 et E2). 195

Figure 61. Analyse de nMDS réalisée à partir d'une matrice de dissimilarité générée par la présence/absence de phylotypes sur les gels TTGE obtenus par amplification (PCR) du gène ARNr 16S. Les analyses de TTGE ont été effectuées pour chaque réplicat à partir des extraits d'ADN des sols contaminés sans consortium en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 et E2), de la plante (MxG), et en absence de traitement (TN), aux différents temps de prélèvement (T0, T1, T2 et T3). Stress : 0,0905. 197

Figure 62. Analyse de nMDS réalisée à partir d'une matrice de dissimilarité générée par la présence/absence de phylotypes sur les gels TTGE obtenus par amplification (PCR) du gène ARNr 16S. Les analyses de TTGE ont été effectuées pour chaque réplicat à partir des extraits d'ADN des sols contaminés avec consortium en présence des mélanges d'exsudats racinaires

(E1 et E2), de la plante (MxG), et en absence de traitement (TN), aux différents temps de prélèvement (T0, T1, T2 et T3). Stress : 0,1266. 199

Figure 63. Analyse de nMDS réalisée à partir d'une matrice de dissimilarité générée par la présence/absence de phylotypes sur les gels TTGE obtenus par amplification (PCR) du gène ARNr 16S. Les analyses de TTGE ont été effectuées pour chaque réplicat à partir des extraits d'ADN des sols contaminés avec consortium et champignon en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 et E2), de la plante (MxG), et en absence de traitement (TN), aux différents temps de prélèvement (T0, T1, T2 et T3). Stress : 0,1629. 200

Figure 64. Nombre de gènes ARNr 16S (moyenne $\pm$ écart type, n=6) présents dans les sols contaminés sans consortium (A), avec consortium (B) et avec consortium plus champignon (C) au cours du temps (de T0 à T3) en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence de traitement (TN). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T1, T2 et T3 pour chaque traitement (orange : TN, violettes : E1, bleues : E2, vertes : MxG, $p < 0,05$). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre chaque traitement à chaque temps de prélèvement T1, T2 et T3 ($p < 0,05$). 206

Figure 65. Nombre de gènes ARNr 18S (moyenne $\pm$ écart type, n=6) présents dans les sols contaminés sans consortium (A), avec consortium (B) et avec consortium plus champignon (C) au cours du temps (de T0 à T3) en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence de traitement (TN). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T1, T2 et T3 pour chaque traitement (orange : TN, violettes : E1, bleues : E2, vertes : MxG, $p < 0,05$). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre chaque traitement à chaque temps de prélèvement T1, T2 et T3 ($p < 0,05$). 212

Figure 66. Nombre de gènes PAH-RHD $_{\alpha}$ GP (moyenne $\pm$ écart type, n=6) présents dans les sols contaminés sans consortium (A), avec consortium (B) et avec consortium plus champignon (C) au cours du temps (de T0 à T3) en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence de traitement (TN). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T1, T2 et T3 pour chaque traitement (orange : TN, violettes : E1, bleues : E2, vertes : MxG, $p < 0,05$). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre chaque traitement à chaque temps de prélèvement T1, T2 et T3 ($p < 0,05$). 219

Figure 67. Concentration en BaA totale (mg.kg^{-1} sol sec, moyenne $\pm$ écart type, n=3) mesurée dans les sols contaminés sans consortium (A), avec consortium (B) et avec consortium plus champignon (C) au cours du temps (de T0 à T3) en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence de traitement (TN). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T1, T2 et T3 pour chaque traitement (orange : TN, violettes : E1, bleues : E2, vertes : MxG, $p < 0,05$). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre chaque traitement à chaque temps de prélèvement T1, T2 et T3 ($p < 0,05$). 227

Liste des tableaux

Tableau 1. Classes granulométriques de la terre fine et catégories des éléments grossiers (NF X31-003, 1998).....	21
Tableau 2. Quantité moyenne des différents microorganismes par gramme de sol (Van-Camp <i>et al.</i> , 2004).....	25
Tableau 3. Phénomènes, compartiments et processus impliquant la solution du sol (Calvet, 2013).....	27
Tableau 4. Composition de l'air du sol et de l'atmosphère extérieure (Gobat <i>et al.</i> , 2010)...	27
Tableau 5. Propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires selon l'US-EPA (Bourcereau, 2008; Girard <i>et al.</i> , 2005; INERIS, 2005; Thion, 2012). MM : masse molaire ; en gras sont présentés les HAP faisant également partis de la liste prioritaire de l'Union Européenne (Lerda, 2011).....	32
Tableau 6. HAP prioritaires selon l'Union Européenne, ne figurant pas dans la liste de l'US-EPA (Lerda, 2011).	33
Tableau 7. Facteurs d'émission de HAP lors de l'utilisation d'appareils de chauffage domestiques (OSPAR Commission, 2001).....	38
Tableau 8. Classification des 16 HAP prioritaires de l'US-EPA selon le CIRC (CIRC, 2016).	42
Tableau 9. Caractéristiques physico-chimiques du benzo(a)anthracène (Girard <i>et al.</i> , 2005; Hartwig, 2012; INERIS, 2005; Thion, 2012).	45
Tableau 10. Teneurs en benzo(a)anthracène retrouvées dans les sols de différents sites pollués.	46
Tableau 11. Exemples de bactéries dégradant les HAP (adapté de Juhasz and Naidu, 2000; Seo <i>et al.</i> , 2009; Zhang <i>et al.</i> , 2006).....	58
Tableau 12. Exemples de champignons dégradant les HAP (adapté de Doyle <i>et al.</i> , 2008; Juhasz and Naidu, 2000; Zhang <i>et al.</i> , 2006).....	62
Tableau 13. Microorganismes capables de dégrader le benzo(a)anthracène.	71
Tableau 14. Métabolites identifiés lors de la dégradation du benzo(a)anthracène par différents microorganismes. Les chiffres colorés correspondent aux molécules de la figure 24.....	73
Tableau 15. Techniques de dépollution des sols (Colombano <i>et al.</i> , 2010; Colombano and Mouvet, 2012; de Boer and Wagelmans, 2016; Khan <i>et al.</i> , 2004). Les cases vertes représentent les techniques pouvant être appliquées aux HAP et les rouges les méthodes	

inappropriées ; 1 : technique de dépollution ex situ ou on site ; 2 : technique de dépollution in situ.	77
Tableau 16. Applicabilité du traitement <i>in situ</i> et <i>ex situ</i> /on site (Hyman and Dupont, 2001).	79
Tableau 17. Composition chimique typique d'une cellule bactérienne (Tchobanoglous <i>et al.</i> , 2003).....	82
Tableau 18. Caractéristiques du couple d'amorces utilisé pour analyser la diversité bactérienne par TTGE.....	119
Tableau 19. Caractéristiques du couple d'amorces utilisé lors du clonage.....	123
Tableau 20. Caractéristiques des amorces utilisées pour cibler les microorganismes en qPCR.	126
Tableau 21. Caractéristiques des amorces utilisées par la société GenoScreen pour identifier la souche fongique.	130
Tableau 22. Conditions du gradient utilisé pour le dosage du BaA en HPLC.	133
Tableau 23. Batterie d'essai utilisée pour les tests d'écotoxicité pour l'expérience de rhizoremédiation.....	135
Tableau 24. Exemples de similarité structurale entre les métabolites secondaires de MxG et le BaA ou ses métabolites de dégradation.....	139
Tableau 25. Quantités de métabolites secondaires extraites à partir des racines de MxG (Técher <i>et al.</i> , 2011).	140
Tableau 26. Différentes combinaisons testées lors du choix du consortium à utiliser pour l'expérience de bioaugmentation/biostimulation.	145
Tableau 27. Concentrations en ADN extrait ($\mu\text{g.g}^{-1}$ sol sec, moyenne $\pm$ écart type, n=3) par les deux méthodes d'extraction (méthode 1 et méthode 2) à partir des sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) au cours du temps (de T0 à T12) en présence (P) ou non (NP) de la plante.....	156
Tableau 28. Ratios de pureté (A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230}) des extraits d'ADN (moyenne $\pm$ écart type, n=3) obtenus par les deux méthodes d'extraction (méthode 1 et méthode 2) à partir des sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) au cours du temps (de T0 à T12) en présence (P) ou non (NP) de la plante. Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre les deux méthodes d'extraction pour les prélèvements de chaque type de sol ($p < 0,05$).	158

Tableau 29. Pourcentage de gènes ARNr 18S par rapport aux gènes ARNr 16S (moyenne $\pm$ écart type, n=6) au cours du temps (de T0 à T12) dans les sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) plantés ou non. 170

Tableau 30. Pourcentage de gènes PAH-RHD α GP par rapport aux gènes ARNr 16S (moyenne $\pm$ écart type, n=6) au cours du temps (de T0 à T12) dans les sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) plantés ou non. 173

Tableau 31. Pourcentage de mortalité de vers de terre adultes *Eisenia fetida* (moyenne $\pm$ écart type, n=3) exposés pendant 14 jours dans du sol non pollué (sol SNC) et pollué (sol SC) en présence de la plante (P) au cours du temps (de T0 à T12). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre les deux types de sol à chaque prélèvement ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre les différents prélèvements pour chaque type de sol ($p < 0,05$). 186

Tableau 32. Pourcentage de gènes ARNr 18S par rapport aux gènes ARNr 16S (moyenne $\pm$ écart type, n=6) au cours du temps (de T0 à T3) dans les sols contaminés sans consortium (SC), avec consortium (C) et avec consortium plus champignon (C + CH) en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence de traitement (TN). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T1, T2 et T3 pour chaque traitement (orange : TN, violettes : E1, bleues : E2, vertes : MxG, $p < 0,05$). 213

Tableau 33. Pourcentage de gènes PAH-RHD α GP par rapport aux gènes ARNr 16S (moyenne $\pm$ écart type, n=6) au cours du temps (de T0 à T3) dans les sols contaminés sans consortium (SC), avec consortium (C) et avec consortium plus champignon (C + CH) en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence de traitement (TN). 220

Tableau 34. Concentrations en BaA dissous et facilement désorbable (mg.kg^{-1} sol sec, moyenne $\pm$ écart type, n=3) mesurées dans les sols contaminés sans consortium (SC), avec consortium (C) et avec consortium plus champignon (C+CH) à T0 et T3 en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence de traitement (TN). La présence d'un astérisque représente une différence significative entre le BaA dissous et facilement désorbable pour chaque échantillon ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre chaque traitement pour chaque fraction biodisponible et chaque type de sol ($p < 0,05$). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre T0 et T3 pour chaque échantillon et chaque fraction biodisponible ($p < 0,05$). 230

Tableau 35. Pourcentage d'émergence des graines d'orge exposées pendant 4 jours (moyenne $\pm$ écart type, n=4) et biomasse des pousses exposées pendant 14 jours après l'émergence des graines (moyenne $\pm$ écart type, n=4) dans les sols contaminés sans consortium (SC), avec consortium (C) et avec consortium plus champignon (C+CH) à T0 et T3 en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence

de traitement (TN). La présence d'un astérisque représente une différence significative entre T0 et T3 pour chaque échantillon et chaque mesure (émergence, biomasse) ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre chaque traitement pour chaque mesure (émergence, biomasse) et chaque type de sol ($p < 0,05$). 233

Liste des abréviations

ANOVA	Analysis of variance
APS	Persulfate d'ammonium
BaA	Benzo(a)anthracène
BH	Bushnell-Haas
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Sérum Albumine Bovine
C	Cytosine
C1	Consortium 1
C2	Consortium 2
CH	Champignon
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
E	Efficacité de la PCR quantitative
E1	Mélange d'exsudats 1 : quercétine, apigénine, catéchine
E2	Mélange d'exsudats 2 : quercétine, apigénine, catéchine, acide gallique
FAO	Food and Agricultural Organization
G	Guanine
HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HPLC	High-Pressure Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
K_D	Coefficient de partage phase liquide/phase solide du sol
K_H	Constante de Henry
K_{OC}	Coefficient de partage du carbone organique
K_{OW}	Coefficient de partage octanol/eau
LB	Lysogeny Broth
MM	Masse molaire
MxG	<i>Miscanthus x giganteus</i>
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nMDS	non-Metric multiDimensional Scaling
NP	Sol non planté (témoin)
OGM	Organisme Génétiquement Modifié
P	Sol planté
PAH-RHD α	PAH-ring hydroxylating dioxygenase
qPCR	PCR quantitative
SNC	Sol non contaminé
SC	Sol contaminé
SOC	Super Optimal Broth
TN	Sol sans mélange d'exsudats
TAE	Tris, acétate, EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TTGE	Temporal Temperature Gradient Electrophoresis

UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
US-EPA	Agence environnementale américaine
W_{dm}	Teneur en matière sèche du sol
W_{H_2O}	Teneur en eau du sol
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La révolution industrielle de la fin du XVIIIème siècle est une des causes de la dégradation de la qualité de la majorité des sols, notamment par contamination de substances toxiques. En France, il existe actuellement plus de 6500 sites et sols qui ont été recensés comme étant pollués, ou potentiellement pollués, par la base de données BASOL¹ (BASOL, 2017). La plupart des sites sont concentrés dans les anciennes régions minières et industrielles comme la région Rhône-Alpes, le Nord-Pas-de-Calais, l’Île de France ou la Lorraine. Aujourd’hui, ces régions sont caractérisées par un grand nombre de friches industrielles en raison de l’arrêt des activités au cours des dernières décennies. Une friche industrielle correspond à un site qui a été affecté par des utilisations antérieures du site ou des terrains environnants, abandonné ou sous-utilisé, se trouvant principalement dans les zones urbaines totalement ou partiellement développées, et qui nécessite une intervention pour le remettre en état d’usage (CABERNET, 2016). Une friche industrielle peut avoir ou non des problèmes de contamination (CABERNET, 2016). Si tel est le cas, les sites vont présenter différents types de pollution selon l’activité qui y était exercée. Parmi elles, la contamination organique par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) représente, à l’heure actuelle, plus de 7 % des sites pollués de France, les plaçant en 2^{ème} position des polluants organiques les plus représentés (BASOL, 2017). Puisque les HAP peuvent conduire à des effets toxiques et notamment cancérigènes, ces composés posent un réel problème environnemental et de santé publique car ils peuvent gagner tous les autres milieux par lessivage, érosion éolienne..., contaminer les espèces végétales et animales et finalement atteindre l’Homme. Comme les sols sont pollués depuis plusieurs dizaines d’années, les HAP ont subi diverses évolutions qui ont affecté leur mobilité et leur biodisponibilité (Ma *et al.*, 2012a). Ces molécules se retrouvent alors généralement séquestrées dans le sol (Alexander, 2000; Bogan and Sullivan, 2003) et donc présentes en grande concentration. Il est ainsi primordial de réhabiliter les friches industrielles pour diminuer le risque de contamination et de dissémination.

De nombreuses techniques de dépollution ont alors été développées comprenant des traitements physiques, chimiques et biologiques. Bien qu’elles soient plus lentes, les

¹ Outil de gestion qui recense depuis le début des années 1990 les sites et sols pollués ou potentiellement pollués appelant une action des pouvoirs publics à titre préventif ou curatif (Antoni, 2013).

méthodes biologiques, qui favorisent la dégradation naturelle du contaminant, s'avèrent moins coûteuses et plus respectueuses de l'environnement que les autres procédés (Khan *et al.*, 2004). De manière générale, elles consistent à stimuler la dégradation microbienne du polluant organique en utilisant, par exemple, des plantes (phyto/rhizoremédiation), des nutriments (biostimulation) ou des microorganismes possédant des capacités catalytiques de dégradation (bioaugmentation). Cependant, la plupart des études qui concernent la remédiation des sols pollués par les HAP s'intéressent plus particulièrement aux composés de faible poids moléculaire tels que le phénanthrène. Or, les HAP de haut poids moléculaire comme le benzo(a)anthracène (BaA) sont plus persistants dans les sols et en général plus toxiques.

Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse consiste à évaluer l'influence d'une plante phytoremédiatrice, *Miscanthus x giganteus* (MxG), sur le devenir et le comportement du BaA dans le sol. Une première expérimentation a été conduite afin d'analyser l'influence rhizosphérique de la plante (phyto/rhizoremédiation) sur une période de 12 mois. Dans le but d'améliorer la compréhension de cet effet, une deuxième expérimentation a été mise en place sur une durée de 105 jours afin d'étudier l'influence de certaines molécules exsudées au niveau du système racinaire de MxG (biostimulation) et de microorganismes spécifiques, associés à sa rhizosphère, ayant des capacités catalytique de dégradation du BaA (bioaugmentation). Ces deux expérimentations ont été menées au laboratoire dans des conditions contrôlées à partir d'un sol artificiellement contaminé afin de suivre uniquement le BaA.

Ce manuscrit de thèse est composé de quatre parties. Dans un premier temps une analyse bibliographique présentera l'état actuel des connaissances sur les sols pollués par les HAP et notamment le BaA, ainsi que des facteurs impactant leur comportement et leur dissipation dans les sols en insistant sur l'influence des espèces végétales. Une seconde partie sera consacrée aux matériels et aux méthodes qui ont été employés pour répondre aux objectifs de la thèse. Ensuite, seront présentés les résultats obtenus à partir des différentes expérimentations ainsi que leurs analyses. Enfin, une dernière partie présentera la conclusion générale et les perspectives de ces travaux de thèse.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Le sol

Le sol est une entité naturelle qui représente la couche superficielle de la croûte terrestre. D'une épaisseur moyenne de seulement un à deux mètres, il n'est qu'une très mince pellicule à l'interface de la lithosphère et de l'atmosphère (Gobat *et al.*, 2010). Du fait de sa multifonctionnalité, il n'existe pas de définition universelle. La première et la plus prédominante fut celle des agronomes qui considéraient le sol comme un milieu de croissance pour les plantes (Bockheim *et al.*, 2005; Certini and Ugolini, 2013). Concernant les géologues, le sol n'était qu'une phase assez courte dans le cycle géologique alors que pour les ingénieurs civils, le sol était une matière terreuse meuble, qui pouvait être déplacée par des machines (Certini and Ugolini, 2013). Ce n'est qu'à la fin des années 1880 qu'un grand changement est intervenu grâce à Vasilij Vasilievich Dokuchaev, père de la pédologie. Il vit au-delà de l'aspect utilitaire du sol et proposa un concept naturaliste (Certini and Ugolini, 2013; Girard *et al.*, 2005). En effet, il comprit que le sol était le résultat de l'interaction entre le temps, les organismes vivants et morts, la roche, le climat et la topographie² (Bockheim *et al.*, 2014; Certini and Ugolini, 2013; Girard *et al.*, 2005).

1.1.1. Composition

Le sol est alors un système dynamique et complexe, constitué de quatre éléments principaux : les matières minérales, les matières organiques (vivantes et non vivantes), la solution du sol (eau), et les gaz (air). Les proportions de ces éléments sont présentées sur la figure 1. L'organisation de la fraction solide du sol qui est représentée par les matières minérales et organiques, forme des pores qui sont occupés par la solution du sol et les gaz.

² Relief, forme, configuration d'un lieu.

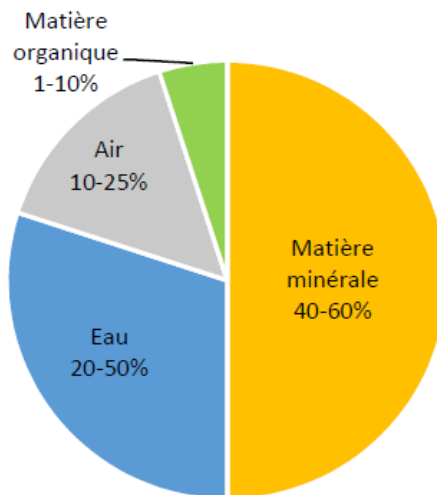


Figure 1. Proportion des principaux composants du sol en volume (White, 2006).
Données de la matière organique : (Calvet, 2013).

1.1.1.1. Les matières minérales

Deux catégories de minéraux sont rencontrées dans le sol : les minéraux primaires et les minéraux secondaires. Les minéraux primaires proviennent de la roche mère à partir de laquelle le sol s'est formé (Calvet, 2003a; Duchaufour, 2001). Certains vont se retrouver intacts dans le sol comme l'épidote et le zircon, qui sont très résistants à l'altération, alors que d'autres, plus vulnérables (de part leur structure et leur composition chimique), vont pouvoir subir une altération plus ou moins grande comme c'est le cas du quartz et du feldspath (Calvet, 2003a). Cette altération va conduire à la formation de nouveaux minéraux, les minéraux secondaires. Ils peuvent également être obtenus par néoformation³ (Girard *et al.*, 2005), ceux-ci formant alors avec les minéraux primaires altérés, le complexe d'altération du sol (Baize, 2016). Les minéraux secondaires comprennent des argiles et des oxydes. La composition de la fraction minérale du sol va alors dépendre de la roche mère et des processus de pédogenèse (Calvet, 2013). Différentes tailles de particules vont alors composer cette fraction (Tableau 1).

³ Formation d'un minéral *via* des éléments en solution.

Tableau 1. Classes granulométriques de la terre fine et catégories des éléments grossiers (NF X31-003, 1998).

	Dimensions	Dénomination
Terre fine	< 2 μm	Argiles
	2 μm à 50 μm	Limons
	50 μm à 2 mm	Sables
Éléments grossiers	2 mm à 2 cm	Graviers
	2 cm à 7,5 cm	Cailloux
	7,5 cm à 12 cm	Pierres
	12 cm à 25 cm	Grosses pierres
	> 25 cm	Blocs

Les proportions des éléments de la terre fine vont définir la texture du sol (Figure 2), qui elle va en déterminer les propriétés physico-chimiques (Calvet, 2013).

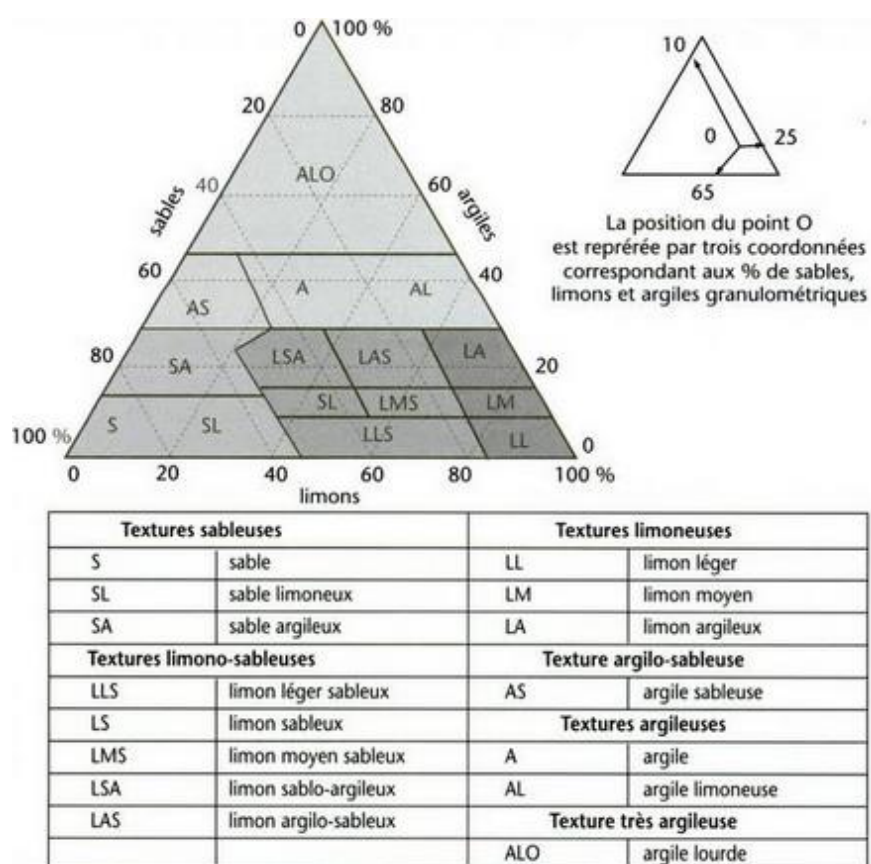


Figure 2. Triangle des textures issu de la carte pédologique de l'Aisne (Calvet, 2003a).

Par exemple, les sols à texture argileuse et très argileuse retiennent mieux l'eau et les éléments nutritifs que ceux à texture plus grossière (White, 2006). Les sols sableux en

revanche ont une infiltration plus rapide et un meilleur drainage (White, 2006). Aussi, la texture va pouvoir influencer la température du sol car en présence d'argiles humides, il mettra plus de temps à répondre à un changement de température atmosphérique (White, 2006). Les éléments grossiers sont toutefois à prendre en compte dans la détermination des propriétés physico-chimiques. En effet, même si des sols possèdent la même texture, la présence plus ou moins importante de ces éléments va influencer leur teneur en eau. D'une manière générale, plus ils seront composés d'éléments grossiers, moins ils contiendront d'eau (White, 2006). De plus, une étude a montré que l'augmentation de la teneur en cailloux pouvait diminuer le rendement des cultures notamment par une difficulté d'implantation de l'espèce végétale (Gras, 1994).

De manière générale, les fractions des limons et des sables sont composées de silicates primaires qui proviennent de la fragmentation de la roche mère (Calvet, 2013; White, 2006). En ce qui concerne la fraction des argiles, elle est généralement constituée d'un mélange de minéraux argileux (argile minéralogique) et de minéraux non argileux comme des oxydes métalliques, des carbonates, des feldspaths et du quartz (Calvet, 2013). Contrairement aux silicates primaires, ces minéraux sont très réactifs en raison de leur grande aire spécifique de surface⁴ et de leurs charges. Ils vont alors influencer la rétention et l'échange de cations et d'anions, l'adsorption d'eau, ou encore, le pH (White, 2006).

1.1.1.2. Les matières organiques

La matière organique du sol est composée de matière organique fraîche (non évoluée), de matière organique transformée, ainsi que d'organismes vivants (Robert, 1996). La matière organique fraîche, de taille grossière, provient des débris des végétaux, des résidus des animaux, ou encore des excréments déposés à la surface du sol (White, 2006). Celle-ci va être transformée *via* des processus physico-chimiques mais également biologiques (Jocteur Monrozier and Duchaufour, 1986) car elle va servir de source d'énergie pour certains organismes. Cette transformation va conduire à l'incorporation du carbone organique dans le sol *via* la formation de la matière organique transformée qui est alors composée de substances humiques et non humiques (Saiz-Jimenez, 1996). Ces dernières correspondent à

⁴ Somme des aires de toutes les particules dont est constitué le matériau (Calvet, 2003a).

des glucides, des protéines, des lignines, ou encore des acides organiques, qui sont des composés de faible poids moléculaire, généralement labiles, et facilement dégradables par les microorganismes (Ndira, 2006; Schnitzer and Khan, 1975). Quant aux substances humiques qui forment l'humus, elles sont constituées principalement d'acides humiques, d'acides fulviques et d'humine, des composés beaucoup plus complexes et plus stables que les matériaux initiaux (Schnitzer and Khan, 1975), dont les caractéristiques majeures sont présentées sur la figure 3.

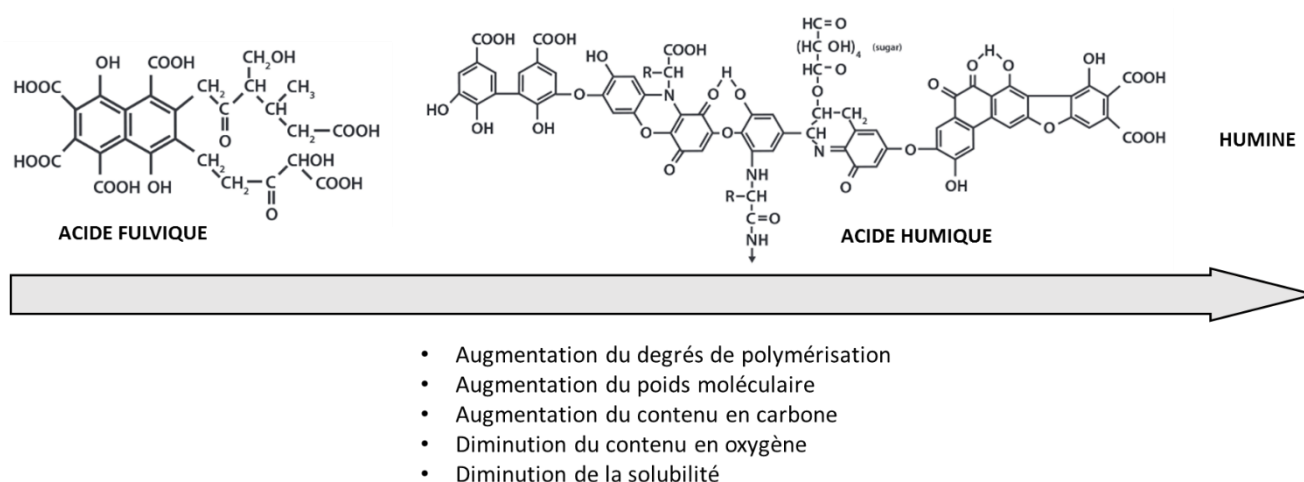


Figure 3. Caractéristiques principales des substances humiques (Rutkowska and Pikula, 2013).

Structures moléculaires de l'acide fulvique et de l'acide humique selon Buffle (1988) et Stevenson (1982), respectivement.

Les acides humiques évolueraient en acides fulviques, puis en humine, lors d'un processus appelé humification (Jocteur Monrozier and Duchaufour, 1986). Cependant, plusieurs théories existent quant à la formation de ces composés (Calvet, 2013). Contrairement aux substances non humiques, elles s'avèrent beaucoup plus récalcitrantes à la dégradation microbienne, notamment *via* la formation de complexes (Schnitzer and Khan, 1975). En effet, étant des molécules polyélectrolytes⁵ et hydrophiles renfermant des cavités hydrophobes (Busnot *et al.*, 1995; Schnitzer and Khan, 1975), les substances humiques ont la capacité de former des complexes solubles et insolubles dans l'eau avec des ions métalliques et des oxydes hydratés et d'interagir avec les minéraux argileux et les composés organiques (Schnitzer and Khan, 1975). Les substances humiques vont alors jouer un rôle important dans les sols puisqu'elles vont permettre sa structuration *via* la formation d'agrégats en se

⁵ Molécule possédant de nombreux sites ioniques (anioniques et cationiques).

liant aux argiles (acides humiques, humine), l'amélioration de la disponibilité des nutriments pour les espèces végétales grâce à la chélation d'ions minéraux (acides humiques et fulviques), ou encore, l'augmentation de sa capacité d'échange cationique (acides fulviques) (Murphy, 2014; Ndira, 2006).

En ce qui concerne les organismes vivants, ceux-ci représentent environ 15 % de la matière organique du sol et sont représentés par les organismes végétaux avec leurs parties souterraines (racines), les organismes animaux (faune) et les microorganismes (Figure 4).

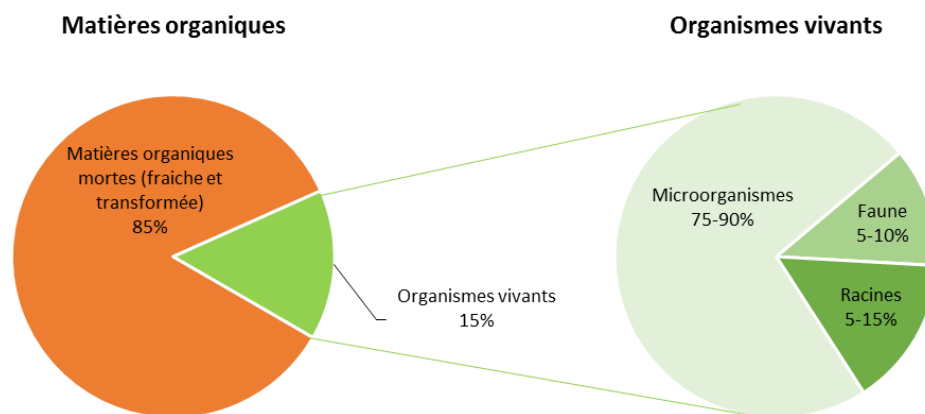


Figure 4. Proportions approximatives en masse des constituants organiques dans des sols cultivés (Van-Camp et al., 2004).

La faune comprend un grand nombre d'organismes qui vivent dans les pores du sol et qui sont classés en fonction de leur taille (Calvet, 2013) :

- la microfaune comprend les organismes d'une taille inférieure à 0,2 mm. Il s'agit principalement de protozoaires et de nématodes ;
- la mésofaune correspond à des organismes dont la taille est comprise entre 0,2 et 4 mm. Elle comprend des microarthropodes (acariens, collembolles,...) ainsi que des nématodes de grande taille et des enchytréides ;
- la macrofaune est constituée d'organismes de taille comprise entre 4 et 8 mm, comme des annélides, des insectes, des mollusques et des arachnides ;
- la mégafaune correspond aux animaux de taille supérieure à 80 mm comme des reptiles et des amphibiens qui utilisent le sol comme habitat.

Les microorganismes, quant à eux, sont représentés par les bactéries, les algues, les champignons et les actinomycètes. Ils représentent la plus grande part de la biomasse

vivante (Figure 4), se chiffrant par millions, voire par milliards dans un gramme de sol (Tableau 2).

Tableau 2. Quantité moyenne des différents microorganismes par gramme de sol (Van-Camp et al., 2004).

Microorganisme	Nombre de cellules / g de sol
Bactérie	10^9
Algue	10^4
Champignon	10^6
Actinomycète	10^7

Même si la faune est moins abondante que les microorganismes, elle est beaucoup plus mobile et son action dans les sols est donc plus étendue à la fois en surface et vers la profondeur (Robert, 1996). La macrofaune et la mésofaune participent à la dégradation des résidus végétaux par des actions mécaniques de broyage et de fragmentation, ainsi qu'à l'évolution des substances humiques par leur tube digestif (Calvet, 2003a). La décomposition de la matière organique est ensuite réalisée par des réactions biochimiques grâce aux microorganismes (Robert, 1996). La dégradation des substrats va alors fournir des nutriments pour la croissance de ces organismes, mais également libérer des éléments essentiels comme l'azote et le phosphore sous une forme disponible, qui vont pouvoir être utilisés comme source de nutriments pour les végétaux (Senn and Kingman, 1973). En retour, les racines fournissent de nombreux composés qui vont servir de source de carbone et d'énergie pour les microorganismes, stimulant alors leur croissance et leur activité (Baudoin *et al.*, 2003). En plus de participer aux cycles biochimiques des éléments, les organismes vivants interviennent également dans la structuration du sol. Par exemple, les mycéliums formés par les champignons maintiennent les agrégats (Rillig *et al.*, 2010), les vers de terre contribuent à la formation de macroagrégats (diamètre $\leq 250 \mu\text{m}$) et de microagrégats (diamètre $> 250 \mu\text{m}$) grâce au mélange et au déplacement de la terre (Calvet, 2013) et les racines ont une action de compaction lors de la pénétration dans le sol (Bruand *et al.*, 1996). Les organismes vivants apparaissent donc comme une composante importante du sol, étant même impliqués dans plusieurs de ses fonctions.

1.1.1.3. La solution du sol

La solution du sol correspond à son eau interstitielle, ses solutés et ses gaz dissous. Elle circule librement dans les macropores (diamètre supérieur à 10 μm) mais se retrouve retenue dans les micropores (diamètre inférieur à 10 μm) par capillarité (Ranjard and Richaume, 2001). Sa composition est déterminée par plusieurs phénomènes présentés sur la figure 5.

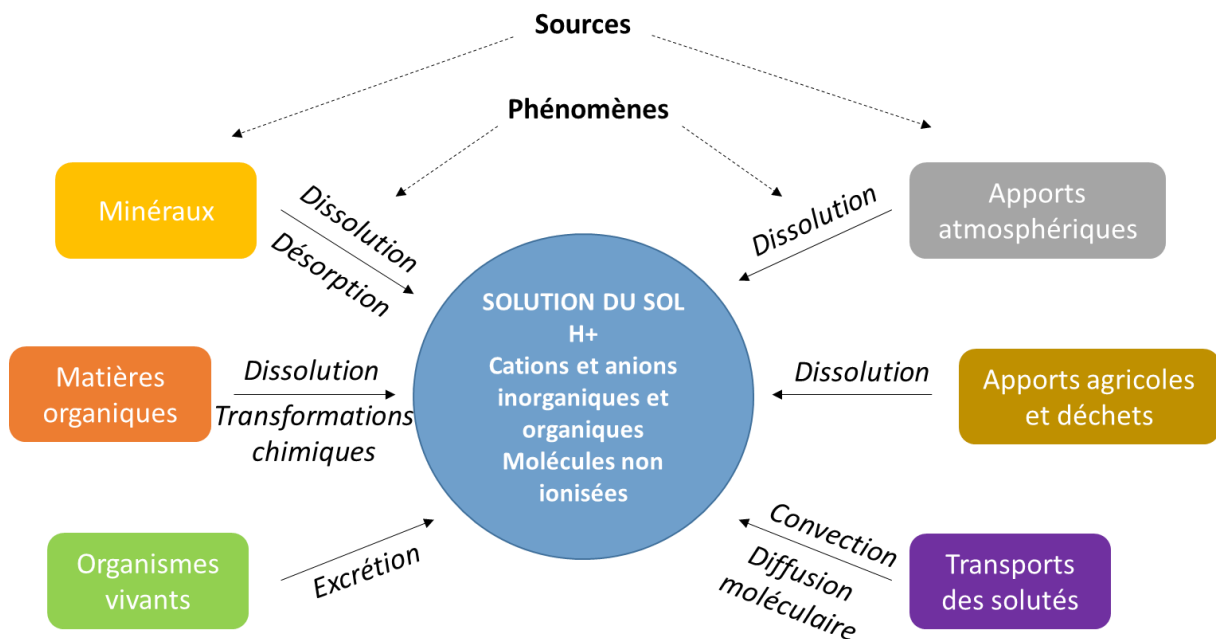


Figure 5. Déterminisme de la composition de la solution du sol (Calvet, 2013).

La solution du sol va alors être le lieu de nombreuses transformations physico-chimiques, impactant les différents compartiments du sol (Tableau 3). Elle est notamment indispensable à la vie des organismes (microorganismes, animaux et végétaux) car elle possède des éléments nutritifs essentiels à leur croissance. De plus, elle affecte l'intégrité de leur membrane cellulaire. La solution du sol doit alors être largement disponible et circulante (Ranjard and Richaume, 2001). Cependant, lorsqu'elle est présente en excès, elle peut conduire à une asphyxie et à un lessivage, impactant alors négativement les organismes.

Tableau 3. Phénomènes, compartiments et processus impliquant la solution du sol (Calvet, 2013).

Phénomènes	Compartiment impacté	Processus
Volatilisation	Phase gazeuse	Pollution de l'atmosphère
Adsorption/désorption Précipitation/dissolution	Phase solide : minéraux et matières organiques	Pédogénèse et dégradation des sols Synthèse et dégradation des composés organiques
Transformations chimiques dans la solution du sol	Solution du sol	Mobilisation et immobilisation des nutriments et des polluants
Absorption	Organismes vivants	Nutrition minérale et toxicité

1.1.1.4. Les gaz

Les gaz dans le sol se retrouvent soit sous forme libre dans son atmosphère ou sous forme dissoute dans sa solution. L'air occupe les pores où l'eau n'est pas présente. Diffusant faiblement dans les micropores (Faugier, 2010), il se retrouve majoritaire dans les macropores et possède une composition proche de celle de l'air atmosphérique (Tableau 4; Calvet, 2013; Gobat *et al.*, 2010).

Tableau 4. Composition de l'air du sol et de l'atmosphère extérieure (Gobat *et al.*, 2010).

Constituant	Air du sol (%)	Atmosphère extérieure (%)
Oxygène	18 à 20,5 en sol bien aéré 10 après de la pluie 2 en structure compacte 0 dans les horizons réduits	21
Azote	78,5 à 80	78
Dioxyde de carbone	0,2 à 3,5 5 à 10 à proximité des racines	0,03
Gaz divers	Traces de H ₂ , N ₂ O, Ar En anoxie : NH ₃ , H ₂ S, CH ₄	1 (surtout Ar, les autres en traces)

L'air du sol est alors principalement composé d'azote et d'oxygène, mais il contient une plus grande concentration en dioxyde de carbone que l'atmosphère extérieure, ainsi que d'autres gaz qui sont des bioproduits du métabolisme microbien (White, 2006). Cependant, le faible renouvellement de l'air, la consommation biologique de l'oxygène, ou encore un excès

d'eau, peuvent conduire à des conditions hypoxiques voire anoxiques. Ceci ne pose généralement pas de problème pour la macrofaune et la mésofaune qui peuvent se déplacer si l'air se raréfie, mais cela est plus problématique pour la microfaune, la microflore et les racines car leurs mouvements sont beaucoup trop lents (Gobat *et al.*, 2010). De plus, une teneur élevée en dioxyde de carbone ralentit l'activité de certains microorganismes (Gobat *et al.*, 2010). Pour pallier à ce problème, des stratégies sont alors mises en place par les organismes comme la sporulation⁶ (bactéries et champignons) et l'enkystement⁷ qui mènent à des formes de vie ralenties (Gobat *et al.*, 2010). Aussi, certains microorganismes possèdent un métabolisme anaérobie qui permet de remplacer l'oxygène par un autre accepteur final d'électron comme le nitrate. La composition de la phase gazeuse du sol est alors déterminée par la respiration des organismes vivants, mais également par des échanges avec l'atmosphère extérieure (O₂, CO₂, CH₄,...) et la solution du sol (dissolution d'O₂, volatilisation de N₂O,...) (Figure 6).

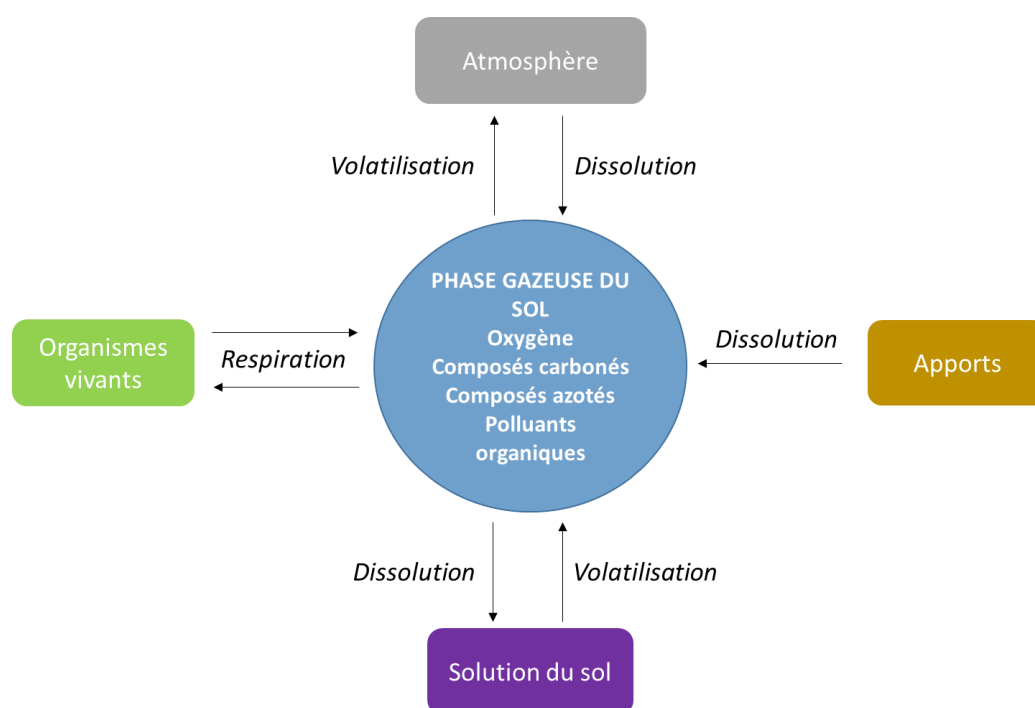


Figure 6. Déterminisme de la composition de la phase gazeuse du sol (Calvet, 2013).

⁶ Aptitude à former des cellules spécialisées, résistantes et dormantes, les spores (Calvet, 2013).

⁷ Aptitude à entrer intrinsèquement dans un stade dormant, souvent en s'entourant d'une enveloppe protectrice épaisse, en accumulant des réserves et en se déshydratant partiellement (Calvet, 2013).

1.1.2. Fonctions

Grâce à ses différents composants, le sol remplit de nombreuses fonctions qui permettent de fournir des services et des biens aux Hommes. Ces fonctions peuvent être classées en trois catégories.

1.1.2.1. Fonctions écologiques

Le sol est un support pour la vie puisqu'il fournit de nombreux habitats très variés grâce à la diversité morphologique de ses pores et contient des éléments nutritifs essentiels à la vie (Ruellan, 2010). De ce fait, un grand nombre et une grande variété d'organismes (microorganismes, animaux et végétaux) y croissent et se développent, faisant du sol une source de biodiversité. Il apparaît donc comme un réservoir biologique mais également génétique (Blum, 2005; Calvet, 2003a), servant notamment de source pour la recherche pharmaceutique (antibiotiques, anticancéreux, antidouleurs,...) (Baduel, 2002).

Le sol agit également comme un filtre pour l'eau et l'air, influençant alors leur qualité. En effet, en circulant dans le sol, des échanges et des transformations vont avoir lieu avec les constituants minéraux et organiques (Ruellan, 2010). La qualité de l'eau va alors être influencée au niveau de ses nutriments et celle de l'air par les gaz à effet de serre (CO_2 , CH_4 , N_2O ...) (Powlson *et al.*, 2011). De plus, si l'eau ou l'air sont pollués, le sol va pouvoir retenir les contaminants (chélation, adsorption), mais également les dégrader *via* sa microflore, dans le cas de contaminants organiques. En revanche, l'effet inverse peut se produire et aboutir à une contamination.

Le sol joue aussi un rôle important dans les cycles biogéochimiques et en particulier dans les cycles du carbone, de l'azote, du soufre ou encore du phosphore (Calvet, 2003a), notamment grâce à la dégradation de la matière organique par les microorganismes. Etant un lieu de régulation des flux de matière et d'énergie, le sol apparaît alors comme un compartiment fondamental pour le fonctionnement des écosystèmes à la surface continentale (Calvet, 2003a).

1.1.2.2. Fonctions socioculturelles

En ce qui concerne ses fonctions socioculturelles, le sol présente une utilité récréationnelle (Finvers, 2008) telle que les terrains de foot, la marche ou le camping et constitue une source d'informations paléontologiques, archéologiques et géologiques (Blum, 2005). Il fait également parti des éléments constitutifs du paysage et contribue à son évolution (Calvet, 2003b).

1.1.2.3. Fonctions économiques

Le sol sert de support mécanique pour les végétaux avec la production agricole et sylvicole mais également pour les infrastructures (Calvet, 2003a). Il fournit donc de la nourriture et des matériaux avec notamment des matières premières telles que l'argile, les sables, les minéraux et la tourbe (Blum, 2005), qui sont utilisées pour le bâtiment et l'industrie, mais aussi pour le chauffage (tourbe) et à des fins artistiques (céramique, maquillage, peinture,...) (Ruellan, 2010).

1.1.3. Protection

Les sols remplissent donc des fonctions vitales pour les sociétés humaines. Cependant, certaines utilisations du sol sont à l'origine de la modification de ses fonctions et contribuent à sa dégradation. En effet, des pratiques agricoles inadéquates (surpâturage, monoculture, usage excessif de fertilisants et de pesticides,...), l'urbanisation, ou encore l'industrie, menacent les sols. 40 à 50 % d'entre eux sont déjà dégradés au niveau mondial du fait des activités humaines (Ruellan *et al.*, 2008). Le plus problématique est, au niveau international, qu'il n'existe aucun traité ou convention de droit international public concernant la gestion des sols, alors qu'ils sont très nombreux pour la biodiversité, la mer, les eaux et la qualité de l'air (problématique de l'effet de serre incluse) (Plavinet and Coquet, 2013). Il existe toutefois une « Charte mondiale des sols » qui a été publiée par la Food and Agricultural Organization (FAO) en 1981, mais elle n'a eu aucune influence. Elle a alors été relancée en 2011 sous la dénomination de « Partenariat mondial pour les sols pour la sécurité alimentaire et l'adaptation au changement climatique et l'atténuation de ses effets »

(Plavinet and Coquet, 2013). Aussi, en Europe, un projet de directive cadre avait été déposé en 2006 afin d'envisager à « préserver, protéger, et restaurer les sols », mais son adoption a été bloquée du fait de l'opposition persistante de plusieurs états membres : l'Allemagne, l'Autriche, le Royaume-Uni et la France, qui affirment déjà disposer des outils réglementaires pour lutter contre la pollution des sols (Brethomé, 2011; Plavinet and Coquet, 2013). En effet, en France, depuis les années 1990, l'absence d'un système de protection des sols a conduit le pouvoir public à créer sa propre politique de protection, en développant des outils de gestion et de suivi, ainsi que des lignes directrices et des mesures d'exécution, sans aucun soutien clair du cadre juridique (Bourgoin, 2006). L'état actuel de protection des sols est donc très limité et une prise de conscience des problèmes liés à leur dégradation s'avère plus qu'urgente.

1.2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

Parmi les facteurs de dégradation des sols, la contamination par substances toxiques touche 6509 sites en France et plus de 7 % sont représentés par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (BASOL, 2017).

1.2.1. Caractéristiques

Les HAP sont des composés organiques constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène dont la structure comprend au moins deux cycles aromatiques condensés de type benzénique liés de façon linéaire, angulaire ou en amas (Figure 7; Edwards, 1983; Sims and Overcash, 1983).

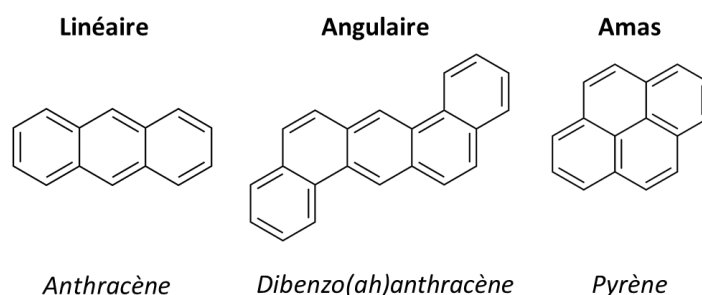


Figure 7. Arrangements moléculaires possibles des HAP.

Il existe à ce jour environ 130 HAP identifiés (INERIS, 2005) dont seulement 16 sont généralement considérés pour les études environnementales car ils ont été jugés comme prioritaires par l'agence environnementale américaine (US-EPA; Wilson and Jones, 1993; Tableau 5). Huit d'entre eux figurent également dans la liste des 15+1 HAP prioritaires de l'Union Européenne (Lerda, 2011; Tableau 5), les 8 autres étant présentés dans le tableau 6.

Tableau 5. Propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires selon l'US-EPA (Bourcereau, 2008; Girard et al., 2005; INERIS, 2005; Thion, 2012). MM : masse molaire ; en gras sont présentés les HAP faisant également partis de la liste prioritaire de l'Union Européenne (Lerda, 2011).

Nom Structure	Formule MM (g.mol ⁻¹)	Solubilité dans l'eau (mg.L ⁻¹)	K _{ow} (Log)	K _{oc} (Log)	Volatilité (Pa)	Temps de demi- vie en jours (j) ou ans (a)
Naphtalène 	C ₁₀ H ₈ 128	32	3,30	3,15	36,8	16 - 48 j
Acénaphtylène 	C ₁₂ H ₈ 152	3,93	4,07	1,4	4,14	-
Acénaphthène 	C ₁₂ H ₁₀ 154	3,42	3,98	3,66	1,52	-
Fluorène 	C ₁₃ H ₁₀ 166	1,90	6,58	6,2	0,715	32 - 60 j
Anthracène 	C ₁₄ H ₁₀ 178	0,07	4,45	4,15	0,078	50 j - 1,3 a
Phénanthrène 	C ₁₄ H ₁₀ 178	1	4,45	4,15	0,113	16 - 200 j
Fluoranthène 	C ₁₆ H ₁₀ 202	0,27	4,90	4,58	8,7.10 ⁻³	140 j-1,2 a
Pyrène 	C ₁₆ H ₁₀ 202	0,16	4,88	4,58	0,012	210 j – 5,2 a
Benzo(a)anthracène 	C ₁₈ H ₁₂ 228	0,0057	5,61	5,3	6,1.10 ⁻⁴	102 j – 1,9 a
Chrysène 	C ₁₈ H ₁₂ 228	0,06	5,16	5,3	8,4.10 ⁻⁷	1 – 2,7 a
Benzo(a)pyrène 	C ₂₀ H ₁₂ 252	0,0038	6,06	6,74	2,3.10 ⁻⁵	57 j – 1,5 a
Benzo(b)fluoranthène 	C ₂₀ H ₁₂ 252	0,001	6,04	5,74	6,7.10 ⁻⁵	360 j – 1,7 a

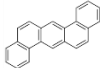
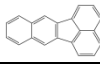
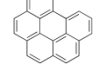
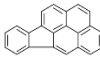
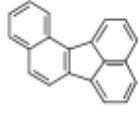
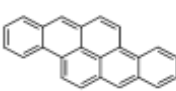
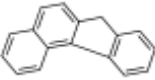
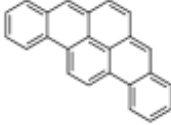
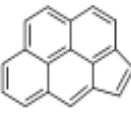
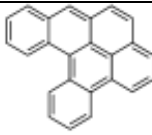
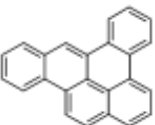
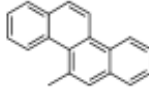
Nom Structure (suite)	Formule MM (g.mol ⁻¹) (suite)	Solubilité dans l'eau (mg.L ⁻¹) (suite)	K _{OW} (Log) (suite)	K _{OC} (Log) (suite)	Volatilité (Pa) (suite)	Temps de demi- vie en jours (j) ou ans (a) (suite)
Dibenzo(ah)anthracène 	C ₂₂ H ₁₄ 278	0,0005	6,84	6,52	9,2.10 ⁻⁸	361 j – 2,6 a
Benzo(k)fluoranthène 	C ₂₀ H ₁₂ 252	0,0008	6,06	5,74	4,2.10 ⁻⁶	2,5 – 5,9 a
Benzo(ghi)pérylène 	C ₂₂ H ₁₂ 276	insoluble	6,50	6,2	2,2.10 ⁻⁵	0,25 – 1,8 a
Indeno(1,2,3-cd)pyrène 	C ₂₂ H ₁₂ 276	0,0008	6,58	6,2	1,3.10 ⁻⁸	1,6 – 2 a

Tableau 6. HAP prioritaires selon l'Union Européenne, ne figurant pas dans la liste de l'US-EPA (Lerda, 2011).

Nom	Structure	Nom	Structure
Benzo(j)fluoranthène 		Dibenzo(ah)pyrène 	
Benzo(c)fluorène 		Dibenzo(ai)pyrène 	
Cyclopenta(cd)pyrène 		Dibenzo(al)pyrène 	
Dibenzo(ae)pyrène 		5-méthylchrysène 	

Les HAP sont classés en deux catégories selon leur poids moléculaire : les « légers » à faible poids moléculaire qui possèdent 2 à 3 cycles et les « lourds » à haut poids moléculaires qui possèdent 4 cycles et plus (Bossert and Bartha, 1986). Les HAP sont également classés en deux groupes selon leur structure : les alternants qui sont des dérivés du benzène par la fusion additionnelle de cycles benzéniques dont la structure possède moins de 8 cycles et les non alternants qui sont composés de cycles à moins de 6 atomes de carbone en plus des cycles benzéniques (Figure 8; Dabestani and Ivanov, 1999; Singh, 2011; Wick *et al.*, 2011). De

nombreuses structures dérivent de ce dernier groupe ce qui augmente considérablement la diversité des HAP (Wick *et al.*, 2011).

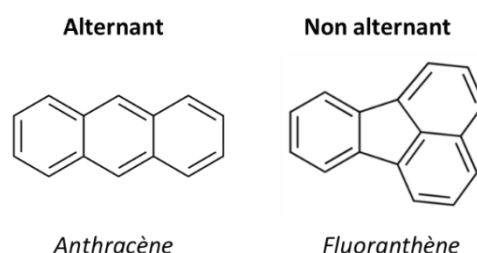


Figure 8. Exemple de HAP alternant et non alternant.

Puisque les cycles benzéniques présentent trois doubles liaisons conjuguées⁸, les HAP possèdent une répartition homogène des électrons π ce qui leur confère une forte stabilité (Brown *et al.*, 2003; Portella *et al.*, 2005). Cette dernière est cependant influencée par l'arrangement moléculaire des cycles, les HAP angulaires étant les plus stables et les linéaires les moins stables (Jouannin, 2004; Singh, 2011). Aussi, la présence de cycles à 5 carbones parmi les cycles benzéniques augmenterait la stabilité des molécules vis-à-vis de la dégradation microbienne (Wammer and Peters, 2005). La stabilité est donc une des propriétés des HAP expliquant la persistance de certains composés dans l'environnement.

La solubilité et la volatilité restent cependant les principales caractéristiques responsables de ce phénomène. Leurs valeurs sont données dans le tableau 5 pour les 16 HAP retenus par l'US-EPA. D'autres paramètres, dont certains sont présentés dans ce même tableau, permettent également d'évaluer le devenir et le comportement des HAP dans les sols :

- le coefficient de partage du carbone organique (K_{OC}) souvent exprimé en log qui traduit la répartition du composé entre la fraction de carbone organique et la fraction eau du sol. Plus le K_{OC} sera élevé, plus le composé aura tendance à se lier à la matière organique. Ce coefficient est en fait un dérivé de la constante K_D qui permet de mesurer la répartition du composé entre la phase liquide et la phase solide du sol. Cette répartition étant fortement dépendante de la concentration en matière organique contenue dans la phase solide, le coefficient K_D peut être corrigé de cette fraction organique pour donner le coefficient K_{OC} ;

⁸ Alternance de doubles liaisons et de simples liaisons.

- le coefficient de partage octanol/eau (K_{OW}) qui traduit la répartition du composé entre l'octanol, un solvant qui possède une polarité similaire à celles des membranes lipidiques, et l'eau. Souvent exprimé en log, ce paramètre va permettre d'évaluer le caractère hydrophobe ou hydrophile de la molécule et d'appréhender sa capacité d'accumulation dans les organismes vivants et de fixation à la matière organique du sol. Ainsi, plus un composé aura un log K_{OW} faible, plus il aura d'affinité pour la phase liquide du sol ;
- la constante de Henry (K_H) exprimée en $\text{Pa.m}^3.\text{mol}^{-1}$ qui traduit la répartition du composé entre l'air et l'eau. Plus la K_H d'un composé sera élevée, plus il sera volatil ;
- le temps de demi-vie qui correspond au temps nécessaire pour une diminution de 50 % de la concentration du composé.

Toutes ces propriétés des HAP dépendent du nombre et de l'assemblage de leurs cycles, ainsi que de leur masse moléculaire. D'une manière générale, les HAP sont caractérisés par un haut point de fusion et d'ébullition, une faible volatilité et une très faible solubilité dans l'eau (Skupinska *et al.*, 2004). Ces deux dernières caractéristiques ont tendance à diminuer avec l'augmentation du nombre de cycle (Wilson and Jones, 1993).

1.2.2. Origine dans l'environnement

1.2.2.1. Mécanismes de formation

Les HAP sont formés essentiellement par des mécanismes de pyrolyse-pyrosynthèse de la matière organique et des imbrûlés. Sous l'effet d'une température supérieure à 500°C, ce phénomène implique le fractionnement des substances organiques en composés instables (principalement des radicaux libres) par la rupture des liaisons carbone-hydrogène et carbone-carbone (Ledesma *et al.*, 2000; Mastral and Callén, 2000; Ravindra *et al.*, 2008). Une partie de ces fragments va réagir avec l'oxygène présent pour former du CO_2 et de l'eau. L'oxygène étant généralement insuffisant pour accomplir une oxydation totale, les autres fragments vont réagir entre eux et se combiner à l'acétylène⁹ pour former une structure qui se condense ensuite en noyaux aromatiques résistants à la dégradation thermique (Pichtel,

⁹ Hydrocarbure gazeux produit par craquage thermique d'hydrocarbures ($\text{H}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$).

2014; Ravindra *et al.*, 2008). Lors du refroidissement, la recombinaison de ces fragments va alors conduire à la formation de nouveaux composés organiques de plus en plus complexes (Mastral and Callén, 2000; Richter and Howard, 2000). Ravindra et ses collaborateurs (2008), illustrent la formation des cycles aromatiques à partir de l'éthane, un hydrocarbure (Figure 9).

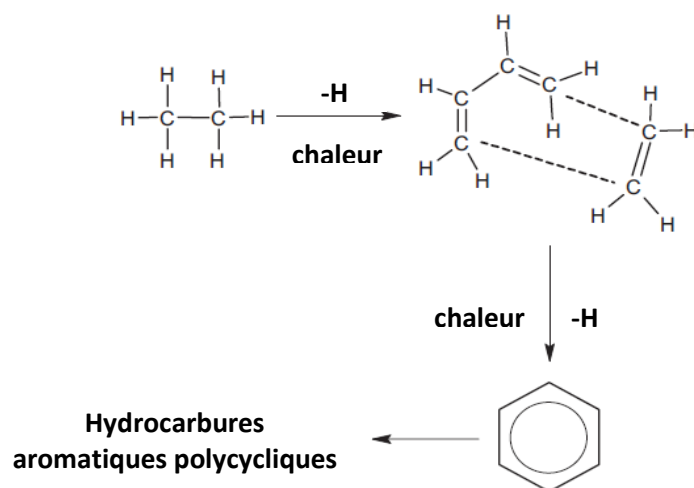


Figure 9. Mécanisme de pyrosynthèse des HAP à partir de l'éthane (Ravindra *et al.*, 2008).

Ces mécanismes peuvent conduire à la formation d'une grande variété de HAP de masse molaire comprise entre 78 (C_6H_6) et 1792 g.mol^{-1} ($\text{C}_{144}\text{H}_{64}$) (Glasier *et al.*, 2001; Lafleur *et al.*, 1996). La composition du combustible de base, la proportion d'oxygène et la température de combustion influencent la nature et l'abondance des HAP formés par les processus de combustion (Ledesma *et al.*, 2000; Marr *et al.*, 1999; Mastral and Callén, 2000; Revuelta *et al.*, 1999). Les HAP à haut poids moléculaire sont cependant les molécules les plus représentées par les mécanismes de pyrolyse-pyrosynthèse (Mojtahid, 2014).

Il existe deux autres modes de formation des HAP, la pétrogénèse et la diagénèse. La pétrogénèse correspond à la synthèse de HAP *via* la formation géologique des combustibles fossiles tels que le pétrole ou le charbon. Ceux-ci sont générés par la dégradation de la matière organique à pression élevée et à température réduite (inférieure à 200°C) (Hansen *et al.*, 2003). En raison de la température relativement basse, les HAP sont formés plus lentement. Le naphthalène et le phénanthrène sont les principaux HAP présents dans les matériels pétrogéniques du fait de leur grande stabilité thermodynamique (Kouzayha, 2011). La source diagénétique quant à elle, correspond aux HAP formés par transformation *via* les organismes vivants (animaux, végétaux, microorganismes) dans une période géologique

relativement courte (Laflamme and Hites, 1979; Wakeham *et al.*, 1980). La modification chimique de certains précurseurs biogénétiques¹⁰ comme les di- et triterpénoïdes¹¹, les pigments (ex : chlorophylle) ou encore les quinones¹², conduisent à la formation de HAP. La transformation du triterpène va, par exemple, produire des HAP tétra et pentacycliques (Laflamme and Hites, 1979; Wakeham *et al.*, 1980) et celle du diterpène, des composés homologues au pérylène et au phénanthrène (Wakeham *et al.*, 1980).

1.2.2.2. Sources d'émission

Les HAP sont émis dans l'environnement à partir de sources anthropiques et naturelles. Ces dernières proviennent évidemment des formations pétrogéniques et diagéniques des composés, mais également des formations pyrolytiques lors de combustions naturelles comme les feux de forêts et les éruptions volcaniques (Ilnitsky *et al.*, 1977; Kim *et al.*, 2003; Vergnoux *et al.*, 2011). Les sources naturelles sont à l'origine de 1 à 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de HAP dans les sols (Edwards, 1983). Diffuses et peu conséquentes, elles représentent moins de 1 % des émissions totales de HAP (Lutz, 2006).

A l'opposé, les sources anthropiques sont plus importantes et affectent donc plus l'environnement. Certains HAP sont produits industriellement pour la préparation de divers plastifiants (naphtalène), de pigments (acénaphène, pyrène), de colorants (naphtalène, anthracène, fluoranthène) et de pesticides (naphtalène, phénanthrène...) (Picot and Montandon, 2013). Cependant, ils ne représentent pas une source de pollution puisque leur production est faible et contrôlée (INERIS, 2006). La pollution environnementale provient essentiellement de 4 sources majeures (Ravindra *et al.*, 2008).

1.2.2.2.1. Les sources domestiques

Les émissions de HAP sont principalement dues à l'utilisation d'appareils de chauffage domestiques (Esen *et al.*, 2008; Junninen *et al.*, 2009). Lors de la combustion, tous les types

¹⁰ Composés formés par un organisme vivant impliqués dans une réaction chimique produisant un ou plusieurs autres composés.

¹¹ Composés organiques produits majoritairement par les végétaux qui contribuent notamment aux phénomènes de communication et de défense.

¹² Transporteurs d'électrons dans la membrane mitochondriale interne (lieu de la respiration) et dans la membrane des thylakoïdes (lieu de la photosynthèse).

de HAP sont formés (Tableau 7). Leur profil dépend peu du combustible et de la technique de combustion utilisée (INERIS, 2006) mais les poêles à bois en émettent 25 à 1000 fois plus que les poêles à charbon (Picot and Montandon, 2013; Tableau 7). Les émissions sont principalement constituées de pyrène, de chrysène et de phénanthrène (Picot and Montandon, 2013), ce dernier étant généralement le plus représenté avec environ 40 % des émissions totales (INERIS, 2006). Le benzo(a)pyrène, par exemple, représente moins de 5 % des émissions de HAP (INERIS, 2006).

Tableau 7. Facteurs d'émission de HAP lors de l'utilisation d'appareils de chauffage domestiques (OSPAR Commission, 2001).

	Emissions de HAP (en mg de HAP/MJ d'énergie consommée)
Combustion de bois	
Chaudière résidentielle de chauffage (11 - 40 kWh)	< 1 - 24 mg/MJ (16 HAP)
Chaudière résidentielle de chauffage, "stoker screw" (23 kWh)	0,1 - 17 mg/MJ (35 HAP)
Poêles à bois (environ 15 kWh)	0,6 - 9 mg/MJ (26 HAP)
Combustion de charbon	
Chaudière résidentielle de chauffage, "stoker screw" (23 kWh)	≈ 0,2 mg/MJ (35 HAP)

1 kWh = 3,6 MJ

Stoker screw : système permettant de charger automatiquement la chaudière en combustible. Ce système peut améliorer les conditions de combustion.

Des HAP sont également émis en cuisine, lors du chauffage de l'huile et de la cuisson des denrées alimentaires (Picot and Montandon, 2013). La composition des fumées de cuisson est très diverse et dépend de plusieurs facteurs comme la composition des aliments, l'huile de cuisson (soja, colza, hydrogénée,...), la température, le temps et la méthode de cuisson (friture, sauter, mijoter,...), ainsi que du style de cuisine (chinoise, indienne, occidentale,...) (Abdullahi *et al.*, 2013). La friture, par exemple, émet plus de HAP que les autres méthodes à cause de la haute température de cuisson et de la grande quantité d'huile à utiliser (Abdullahi *et al.*, 2013). Les HAP à haut poids moléculaires vont plutôt être retrouvés lors des modes de cuisson à haute température et ceux à faible poids moléculaire lors des cuisson à basse température (Abdullahi *et al.*, 2013). Les teneurs en HAP émises à partir des cuisines peuvent être très élevées puisque dans une ville au sud de Taiwan 8973 kg de HAP sont émis chaque année à cause des cuisines des habitations et des restaurants (Li *et al.*, 2003). Les pays en voie de développement sont particulièrement touchés par ce type d'émission car pour chauffer leurs aliments, ils utilisent du bois, des bouses séchées et des résidus

agricoles, qui sont eux-mêmes sources de HAP (Ravindra *et al.*, 2008). Il en est de même avec le charbon de bois qui est utilisé pour la cuisson au barbecue, une méthode également utilisée dans les pays développés, principalement en été (Dyremark *et al.*, 1995).

La cigarette fait également partie des sources d'émission domestique de HAP. Les teneurs présentes dans la fumée principale¹³ peuvent varier de 801 à 2673 ng de HAP (14 HAP) par cigarette en fonction de la composition du tabac, de la ventilation du filtre, de la marque et du pays (Ding *et al.*, 2006). Les HAP à faible poids moléculaire sont les composés principaux puisqu'ils représentent environ 90 % des HAP totaux émis par la fumée de cigarette (Ding *et al.*, 2006).

1.2.2.2.2. Les sources mobiles

Des HAP sont produits lors du transport routier (Nielsen, 1996; Tuháčková *et al.*, 2001) par la combustion des carburants. Les taux d'émission varient de quelques nanogrammes par kilomètre à plus de 1000 mg.km⁻¹ selon les composés et le type de véhicule (Picot and Montandon, 2013). Les principaux polluants rejetés par les véhicules dotés de moteurs à essence sont le fluoranthène et le pyrène, tandis que le naphthalène et l'acénaphthène prédominent dans les gaz d'échappement des moteurs diesel (Picot and Montandon, 2013). Les véhicules légers sont principalement une source de HAP à haut poids moléculaire (4-5 cycles) alors que les moteurs diesel de véhicules lourds émettent principalement des HAP à 3 cycles (Marr *et al.*, 1999).

1.2.2.2.3. Les sources industrielles

Les sources industrielles d'HAP comprennent la production d'aluminium, la production de coke¹⁴ (dans le cadre de la production de fer et d'acier), la production de ciment, les industries pétrochimiques, les industries du bitume et de l'asphalte, l'incinération des déchets ménagers, les chaudières des centrales thermiques, les industries du bois (en

¹³ Fumée inhalée directement par le fumeur.

¹⁴ Combustible produit par pyrolyse d'un mélange de charbon afin d'en éliminer les matières volatiles.

particulier la créosote¹⁵), ou encore les industries de fabrication de pneus en caoutchouc (PAHs position paper, 2001). L'émission de HAP à partir de diverses cheminées industrielles (haut fourneau, cokerie, convertisseur à oxygène, four à arc électrique, centrale électrique, usine de pétrole lourd, usine de ciment) est comprise entre 77 (haut fourneau) et 3970 µg (usine de pétrole lourd) par kilo de matière première (Yang *et al.*, 1998). De fortes concentrations en HAP de haut poids moléculaire sont retrouvées pour les cokeries, les fours à arc électrique et les usines de pétrole lourd (Yang *et al.*, 1998). En ce qui concerne l'incinération des déchets ménagers, une plus grande quantité de HAP est produite à partir de la pyrolyse des plastiques par rapport à la pyrolyse de biomasse (Zhou *et al.*, 2015). Le naphtalène est le polluant majoritaire issu de l'incinération des biomasses tandis que le phénanthrène et le fluorène sont les composés principaux émis à partir des plastiques (Zhou *et al.*, 2015).

1.2.2.2.4. Les sources agricoles

Les sources agricoles de HAP correspondent au brûlage des résidus de culture comme la chaume, la paille et la broussaille, ainsi que, par exemple, du brûlage des bruyères à des fins de régénération (Ravindra *et al.*, 2008). Les quantités de HAP produites ne sont pas négligeables puisque les teneurs émises pendant le brûlage de canne à sucre sont comparables à celles de plusieurs centres urbains (Godoi *et al.*, 2004).

Il existe donc de nombreuses sources anthropiques responsables de la contamination de l'environnement par les HAP. Bien qu'ils soient majoritairement émis dans l'atmosphère, les HAP vont pouvoir gagner tous les milieux *via* le vent et la pluie (Figure 10).

¹⁵ Produit issu le plus souvent de la distillation de la houille (roche sédimentaire d'origine biochimique et riche en carbone) qui est utilisé pour préserver le bois.

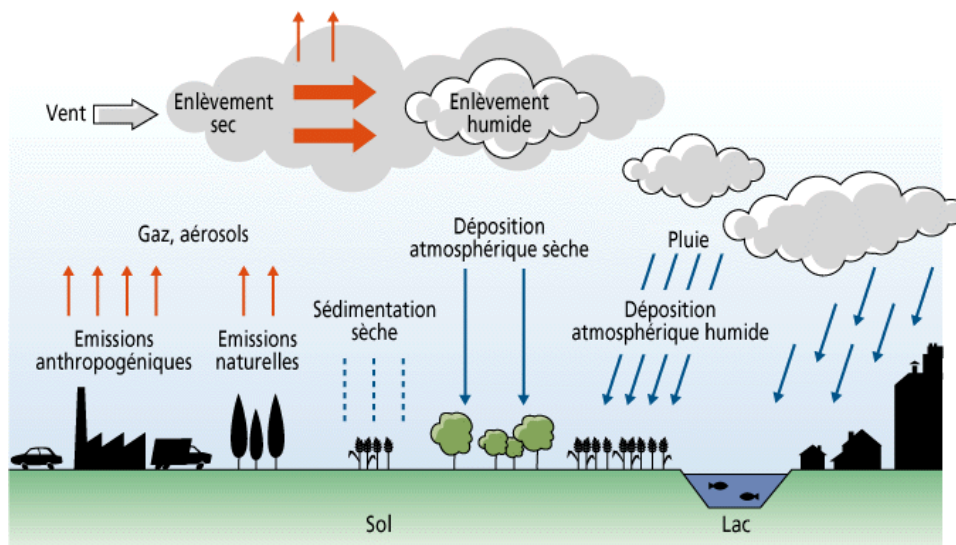


Figure 10. Processus de dépôt des polluants (Dahnoun, 2013).

En France, en 2013, environ 20 tonnes de HAP ont été émis dans l’atmosphère avec comme principal émetteur, le secteur résidentiel/tertiaire du fait essentiellement de la combustion de biomasse (Figure 11).

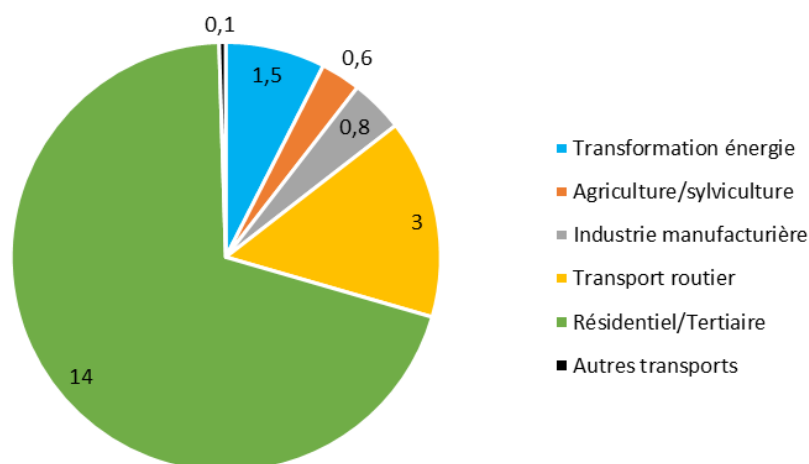


Figure 11. Emission de HAP dans l'atmosphère en France métropolitaine par secteur (en t), en 2013 (CITEPA, 2016).

1.2.3. Toxicité

Les HAP sont des composés toxiques dont le risque pour l’environnement et la santé humaine est accru de par leurs nombreuses sources d’émission, leur caractère ubiquiste et leurs propriétés physico-chimiques (hydrophobicité, faible volatilité). Selon la molécule, le

type d'exposition, l'organisme, les cellules cibles, ainsi que des conditions environnementales, la toxicité des HAP va différer.

Chez l'Homme et les animaux, les HAP peuvent pénétrer par inhalation, contact cutané ou ingestion *via* la chaîne alimentaire principalement. Les organismes peuvent ingérer des produits contaminés par dépôts atmosphériques, notamment des végétaux, mais aussi par bioaccumulation puisque les HAP vont s'accumuler tout au long de la chaîne trophique du fait de leur caractère hydrophobe. Une fois dans l'organisme, ils se retrouvent au niveau des tissus adipeux et de certains organes, notamment le foie, lieu de détoxification. Les HAP sont alors métabolisés par l'action des enzymes de la famille des cytochromes P450 (Kim *et al.*, 1998; Luch *et al.*, 2002). La métabolisation des HAP permet leur élimination par les systèmes biliaires et urinaires en rendant leurs métabolites plus solubles. Cependant, les réactions de détoxification peuvent conduire à la formation de composés plus réactifs que la molécule initiale qui vont pouvoir interagir avec l'ADN, provoquer des mutations génétiques et donc initier des cancers (Cavallo *et al.*, 2006; Sánchez-Guerra *et al.*, 2012; Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004; Siddens *et al.*, 2015). Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé les HAP selon leur degré de cancérogénicité pour l'être humain (Tableau 8).

Tableau 8. Classification des 16 HAP prioritaires de l'US-EPA selon le CIRC (CIRC, 2016).

HAP	Classement CIRC	
Naphtalène	-	
Acénaphthylène	-	
Acénaphthène	3	
Fluorène	3	
Anthracène	3	
Phénanthrène	3	
Fluoranthène	3	
Pyrène	3	
Benzo(a)anthracène	2B	
Chrysène	2B	
Benzo(a)pyrène	1	
Benzo(b)fluoranthène	2B	
Dibenzo(ah)anthracène	2A	
Benzo(k)fluoranthène	2B	
Benzo(ghi)pérylène	3	
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	2B	
		Groupe 1 : substance cancérogène
		Groupe 2A : substance probablement cancérogène
		Groupe 2B : substance possiblement cancérogène
		Groupe 3 : substance inclassable quant à sa cancérogénicité

La cancérogénicité est généralement associée à des HAP contenant 4 à 6 cycles. En effet, certaines de ces molécules possèdent des configurations structurales particulières appelées régions baie et fjord (Figure 12) qui conduisent à la formation d'époxydes très réactifs pendant leur métabolisation. Elles induisent un encombrement stérique de l'époxyde hydrolase qui intervient dans l'élimination des époxydes (Desler *et al.*, 2009), ce qui favorise alors les réactions d'oxydation et la formation de radicaux. Cependant, il existe des HAP sans région baie ni fjord comme l'anthanthrène, un composé à 6 cycles, qui induit des dommages liés à l'ADN chez l'Homme lors de sa métabolisation (Desler *et al.*, 2009) ainsi que des tumeurs de la peau chez la souris (Cavalieri *et al.*, 1977).

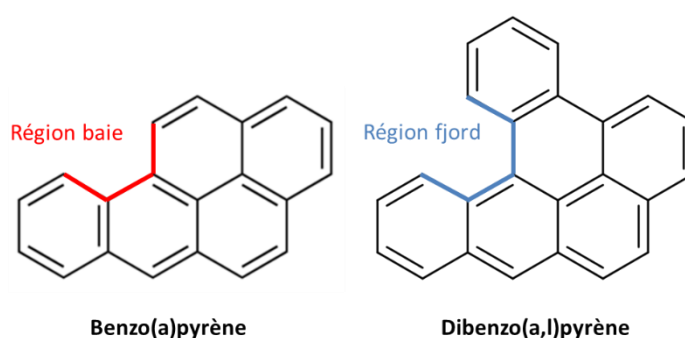


Figure 12. Illustration des régions baie et fjord chez le benzo(a)pyrène et le dibenzo(a,l)pyrène respectivement.

Les HAP s'avèrent également immunotoxiques car ils peuvent être immunosuppresseurs avec une inhibition de la phagocytose, ou immunostimulateurs, en étant impliqués dans des processus inflammatoires *via* la formation de lymphocytes (Grundy *et al.*, 1996; Reynaud and Deschaux, 2006). Ils présentent aussi un caractère reprotoxique avec une diminution de la capacité reproductive (Diamond *et al.*, 1995) ou une ovotoxicité (Hoyer, 2001) et sont responsables de troubles hépatiques avec l'apparition de stéatose¹⁶, d'hémossidérose¹⁷ ou de mégaloocytes¹⁸ (Landahl *et al.*, 1990), ainsi que de troubles hématologiques comme l'anémie hémolytique¹⁹ (Troisi *et al.*, 2007). Les risques les plus importants liés aux HAP restent cependant leur effet mutagène et cancérigène.

En ce qui concerne les végétaux, ceux-ci peuvent être exposés aux HAP au niveau des racines ou des parties aérienne (Fismes *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2007; Oguntimehin *et al.*, 2008). Au

¹⁶ Accumulation de graisse dans les cellules du foie.

¹⁷ Surcharge en fer dans le foie.

¹⁸ Globules rouges anormaux caractérisés par une grande taille.

¹⁹ Diminution du taux de globules rouges dans le sang par destruction prématurée.

niveau racinaire, bien que les HAP soient plus facilement absorbés dans les racines qu'adsorbés à la surface (Jiao *et al.*, 2007), la pénétration racinaire va augmenter avec leur K_{OW} mais est limitée par leur nombre de cycles aromatiques (Tao *et al.*, 2009). Lorsqu'ils sont absorbés dans les racines, ils peuvent être transportés vers les parties aériennes (Fismes *et al.*, 2002; Wild *et al.*, 2005). Comme le transfert vers les feuilles dépend du flux de transpiration dans la plante, la translocation des HAP augmente avec leur solubilité et diminue avec leur K_{OW} . Le transport vers les feuilles ne serait possible que pour les composés dont le K_{OW} est compris entre -1 et 5 (Desalme, 2011). Le prélèvement racinaire des HAP reste cependant très faible et ne concernerait que les sols fortement pollués dont les teneurs sont supérieures à 10-100 mg par kg de matière sèche (Desalme, 2011). Ceci peut également être expliqué par le caractère hydrophobe des molécules, celles-ci se retrouvant fixées à la matière organique de sol. La contamination se fait donc majoritairement par voie aérienne (Kipopoulou *et al.*, 1999) et les concentrations retrouvées dans les végétaux sont en général corrélées avec les concentrations retrouvées dans l'atmosphère. La partition gaz/particule des HAP conditionne leur localisation dans les feuilles (Kipopoulou *et al.*, 1999; McLachlan, 1999). En effet, les HAP gazeux sont capables de pénétrer dans les tissus internes des feuilles tandis que les HAP particuliers restent majoritairement dans la cuticule (Howsam *et al.*, 2000; McLachlan, 1999). La toxicité des HAP va se traduire, par exemple, par une inhibition de l'activité photosynthétique (Kummerová *et al.*, 2006; Mallakin *et al.*, 2002), une inhibition de la germination et de la croissance (Alkio *et al.*, 2005; Henner *et al.*, 1999; Kummerová *et al.*, 2006) ou encore par une diminution de l'efficacité d'approvisionnement en eau et en nutriments (Kummerová *et al.*, 2001; Kummerová and Kmentová, 2004).

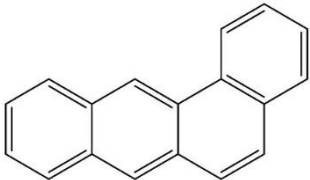
Chez les microorganismes, les HAP présentent également des effets délétères. Par exemple, chez la cyanobactérie *Prochlorococcus*, ils altèrent la division cellulaire des organismes en réduisant la synthèse de l'ADN et en diminuant le pourcentage de cellules entrant en mitose, ce qui conduit à une diminution du taux de croissance (Cerezo and Agustí, 2015). Les HAP sont alors responsables d'un déclin de certaines populations de microorganismes moins tolérantes aux polluants, conduisant ainsi à une modification de la composition des communautés microbiennes (Shrestha *et al.*, 2015). Les bactéries à Gram négatif s'avèrent plus tolérantes aux HAP que les bactéries à Gram positif car elles possèdent des propriétés différentes de perméabilité des membranes (Stancu and Grifoll, 2011). En effet, chez les

bactéries à Gram négatif, la pénétration des molécules lipophiles est 20 à 100 fois plus faible que chez les bactéries à Gram positif (Stancu and Grifoll, 2011). Ceci peut s'expliquer par le fait que les pompes d'efflux (transporteurs membranaires) des bactéries à Gram négatif traversent à la fois la membrane cytoplasmique et la membrane externe (Nikaido, 1996; Zgurskaya and Nikaido, 2000). Grâce à l'action synergique de ces deux dernières, les pompes sont alors beaucoup plus efficaces que celles des bactéries à Gram positif qui elles transportent le composé jusqu'à seulement une membrane (Nikaido, 1998). En effet, ceci est plutôt inefficace puisque les pompes entrent en compétition avec l'influx spontané, rapide, des molécules lipophiles vers le cytoplasme (Nikaido, 1998). Un haut taux d'efflux est donc requis pour produire un niveau de résistance significatif. Aussi, la membrane externe des bactéries à Gram négatif est composée de lipopolysaccharides, ce qui crée une barrière de perméabilité (Prescott *et al.*, 2010). Elle possède cependant des porines (protéines membranaires formant des canaux) par lesquelles les composés la traversent, mais en présence d'une molécule hydrophile ou lorsque les mécanismes des pompes d'efflux sont induits, il y a une diminution du nombre de porines ce qui conduit à une diminution de la pénétration de la molécule (Nikaido, 1998, 2003).

1.2.4. Les caractéristiques du benzo(a)anthracène

Le benzo(a)anthracène (BaA) est un HAP composé de 4 cycles aromatiques dont les caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le tableau 9.

Tableau 9. Caractéristiques physico-chimiques du benzo(a)anthracène (Girard *et al.*, 2005; Hartwig, 2012; INERIS, 2005; Thion, 2012).

	Formule chimique : C ₁₈ H ₁₂
	Masse molaire : 228 g.mol ⁻¹
	Solubilité dans l'eau : 0,0057 mg.L ⁻¹
	Log K_{ow} : 5,61
	Log K_{oc} : 5,3
	Volatilité : 6,1.10 ⁻⁴ Pa
	Temps de demi-vie : 102 jours – 1,9 ans
	Point de fusion : 160°C
	Point d'ébullition : 438°C

Il est généralement retrouvé dans les sols d'anciens sites de cokeries, d'usines à gaz et de traitement du bois (utilisation de créosote), à des concentrations allant de 4 à 624 mg.kg⁻¹ (Tableau 10).

Tableau 10. Teneurs en benzo(a)anthracène retrouvées dans les sols de différents sites pollués.

Teneur en BaA (mg.kg ⁻¹)	Site pollué	Références
61 93 129	Cokerie	Bispo <i>et al.</i> , 1999
230		Eom <i>et al.</i> , 2007
143		Joner and Leyval, 2003
7,031		Sun <i>et al.</i> , 2012
4 61		Técher <i>et al.</i> , 2012b
624		Smith <i>et al.</i> , 2006
300	Traitement du bois (créosote)	Ahtiainen <i>et al.</i> , 2002
13,2 37,1 53,5		Čvančarová <i>et al.</i> , 2013
105,8		Weissenfels <i>et al.</i> , 1992
84,5		García-Delgado <i>et al.</i> , 2015
145		Bezza and Nkhalambayausi Chirwa, 2016
10,4	Usine à gaz	Čvančarová <i>et al.</i> , 2013
74,06		Potin <i>et al.</i> , 2004a
80,83 103,07		Potin <i>et al.</i> , 2004b
95,7	Raffinerie de pétrole	Weissenfels <i>et al.</i> , 1992
44	Centrale à charbon	Joner and Leyval, 2003

Ce HAP de haut poids moléculaire est suspecté d'être cancérigène puisque sa structure présente une région baie. En effet, après avoir été métabolisé par les monooxygénases du cytochrome P450 puis par des époxydes hydrolases, ses métabolites peuvent conduire à la formation d'adduits à l'ADN. Ces derniers ont pu être retrouvés dans des cellules épithéliales (*in vitro*) et de moelle osseuse (*in vivo*) chez le rat après exposition avec du BaA (Hartwig, 2012). Aussi, des aberrations chromosomiques, une inhibition de la synthèse de l'ADN ou encore une augmentation des échanges entre chromatides sœurs ont pu être observés dans des cellules somatiques de mammifères (rat, hamster) (Hartwig, 2012) tout comme la détection d'aberrations chromosomiques dans des ovocytes de souris (Péter *et al.*, 1979). Le

BaA est également responsable de l'apparition de tumeurs dans le foie, la peau et les poumons chez la souris (Hartwig, 2012). Il est classé dans le groupe des substances possiblement cancérogènes pour l'homme (2B) par le CIRC.

Cette toxicité semble provenir du métabolisme du composé BaA-3,4-dihydrodiol puisque des études de Wood et ses collaborateurs (1976, 1977b) ont montré que son produit était 10 fois plus mutagène envers la bactérie *Salmonella typhimurium* TA 100 que le BaA et d'autres métabolites dihydrodiols, ainsi que 10 à 20 fois plus tumorigène chez la souris CD-1 femelle que le BaA. Ceci proviendrait du métabolisme des diastéréoisomères²⁰ du composé BaA-3,4-diol-1,2-époxyde (Wood *et al.*, 1976, 1977a). En effet, ceux-ci (Figure 13) se sont montrés 15 à 35 fois plus mutagènes envers la bactérie *Salmonella typhimurium* TA 100 et 65 à 125 fois plus mutagènes envers des cellules pulmonaires d'hamster que les autres diastéréoisomères des composés BaA-8,9-diol-10,11-époxyde et BaA-10,11-diol-8,9-époxyde (Wood *et al.*, 1977a). Le métabolite BaA-3,4-diol-1,2-époxyde est alors considéré comme l'agent cancérigène ultime du métabolisme du BaA.

Outre sa génotoxicité et sa cancérogénicité, le BaA s'avère également immunotoxique puisqu'une diminution du nombre de cellules lymphatiques a été observée chez la souris après des injections subcutanées de BaA pendant 40 semaines (Hartwig, 2012).

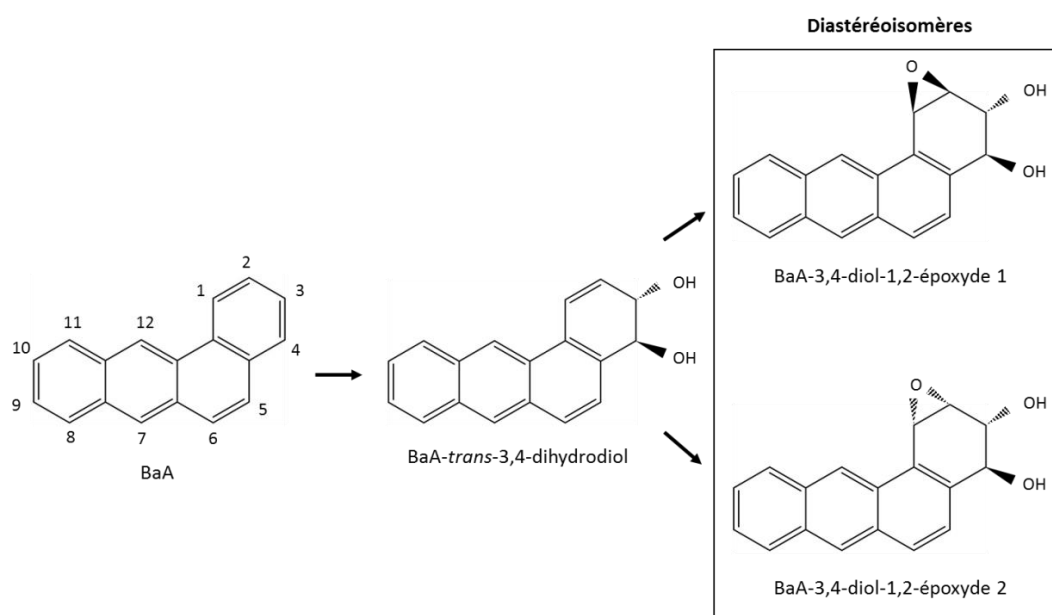


Figure 13. Structure des diastéréoisomères issus du BaA-trans-3,4-dihydrodiol lui-même issu du BaA.

²⁰ Molécules ayant le même enchaînement d'atomes, mais qui ne sont ni superposables, ni image l'une de l'autre dans un miroir.

1.3. Devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les sols

Les sols constituent le réservoir ultime des HAP (Haritash and Kaushik, 2009) puisqu'ils peuvent contenir 90 % des composés émis dans l'environnement (Zhu *et al.*, 2006). Le devenir de ces molécules va alors dépendre d'un ensemble de processus physico-chimiques et biologiques qui vont influencer leur transport, leur séquestration et ainsi leur biodisponibilité et dissipation (Figure 14).

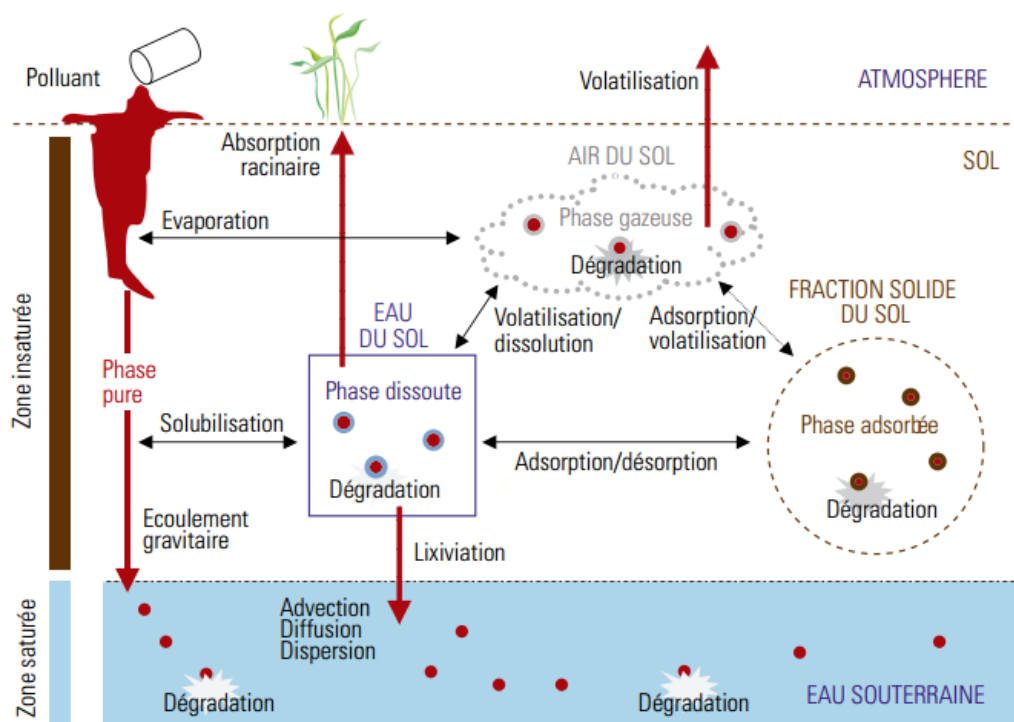


Figure 14. Processus influençant le devenir des polluants dans les sols (Maes *et al.*, 2006).

1.3.1. Transport et séquestration

La mobilité des HAP est dépendante des caractéristiques physico-chimiques du sol (pH, composition et teneur en matière organique,...), des polluants (solubilité, K_H , K_{OW} ,...), ainsi que des facteurs environnementaux (température, précipitation,...). Ils vont pouvoir passer dans les différentes fractions du sol (liquide, solide et gazeuse) par des phénomènes de volatilisation, adsorption/désorption et dissolution. Peu d'entre eux vont se retrouver dans la fraction gazeuse du sol du fait de leur faible volatilité. Comme ils sont peu solubles dans l'eau, les HAP vont plutôt avoir tendance à s'adsorber à la matière organique. En effet, elle possède de nombreuses liaisons hydrophobes, ce qui en fait le principal sorbant des HAP.

(Ahangar, 2010). Une adsorption sur les argiles (matière minérale du sol) est toutefois possible mais elle est très faible, notamment si de la matière organique n'y ait pas adsorbée (Murphy *et al.*, 1990). Il s'agit alors plutôt d'une adsorption sur les associations organo-minérales. Plus la solubilité des polluants sera faible, plus l'adsorption à la matière organique sera élevée. Il en est de même avec les conditions physico-chimiques du sol, plus le pH (Laor *et al.*, 1998; Ping *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2001), la température (Ping *et al.*, 2006) et la force ionique de la solution du sol (Jones and Tiller, 1999) seront faibles, plus l'adsorption sera élevée. En ce qui concerne le pH, certains auteurs n'ont toutefois pas observé d'effet (Subramaniam *et al.*, 2004). L'adsorption des HAP sera également plus importante avec l'augmentation de l'aromaticité de la matière organique. C'est pourquoi, les polluants vont principalement s'adsorber sur l'humine, suivi par les acides humiques et enfin les acides fulviques (Guthrie *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 1990; Nieman *et al.*, 1999; Piatt and Brusseau, 1998). Outre la présence de matière organique, la texture du sol va également influencer l'adsorption des HAP puisque plusieurs études ont montré que les polluants étaient préférentiellement associés à la fraction fine du sol (Amellal *et al.*, 2001b, 2001a).

En plus du mécanisme d'adsorption, les polluants vont pouvoir se retrouver physiquement séquestrés dans les micropores des particules de sol (Nam *et al.*, 2003) ainsi que dans les nanopores dont le diamètre est inférieur à 100 nm (Hatzinger and Alexander, 1997; Nam and Alexander, 1998; Figure 15). La séquestration est un mécanisme à cinétique plus longue que l'adsorption (Kottler and Alexander, 2001) puisqu'elle est retardée par cette dernière mais également car c'est un phénomène qui évolue au cours du temps. Du fait de l'encombrement stérique des HAP à haut poids moléculaire (Kottler and Alexander, 2001) et de la solubilité des HAP à faible poids moléculaire, la séquestration diminue avec l'augmentation de la masse moléculaire des composés.

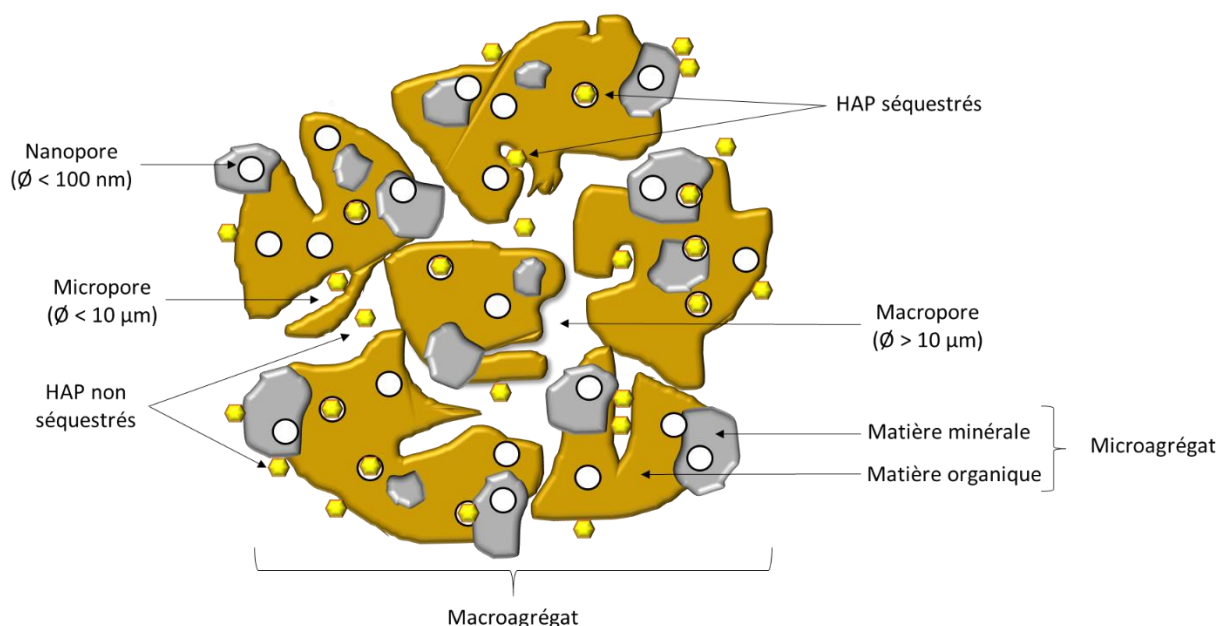


Figure 15. Séquestration des HAP dans le sol.

Le transport des HAP vers la solution du sol peut se produire par la solubilisation du composé. Cependant, ce phénomène est plutôt mineur puisque les HAP sont hydrophobes et ne concerne que les HAP à faible poids moléculaire. La mobilité des composés se produit alors essentiellement par des associations avec des colloïdes, généralement de la matière organique dissoute (Kögel-Knabner and Totsche, 1998; Liu and Amy, 1993; Magee *et al.*, 1991). La présence de cette dernière peut toutefois réduire la mobilité des HAP en se sorbant au sol (Totsche *et al.*, 1997). Il s'agira alors de co-sorption de HAP.

L'adsorption et la séquestration sont donc à l'origine de la stabilisation de la contamination par la formation de résidus non extractibles. Elles ne sont toutefois pas totalement irréversibles puisque des phénomènes de désorption peuvent avoir lieu. Ceux-ci vont être influencés par les propriétés des polluants (nombre de cycle, solubilité,...), ainsi que par la structure (micropores, nanopores) et les caractéristiques physico-chimiques du sol (pH, température,...). En revanche, l'adsorption et la séquestration vont pouvoir être accentuées par l'augmentation du temps de contact entre le polluant et la phase solide du sol (de plusieurs mois à plusieurs années), ce qui correspond au processus de vieillissement de la contamination (Bogan and Sullivan, 2003; Ma *et al.*, 2012a; Nam *et al.*, 1998). Ceci conduit à une diminution de la biodisponibilité des HAP (Figure 16) qui est définie par la fraction du

composé qui peut être prélevée et/ou transformée par un organisme vivant (Cajthaml, 2006).

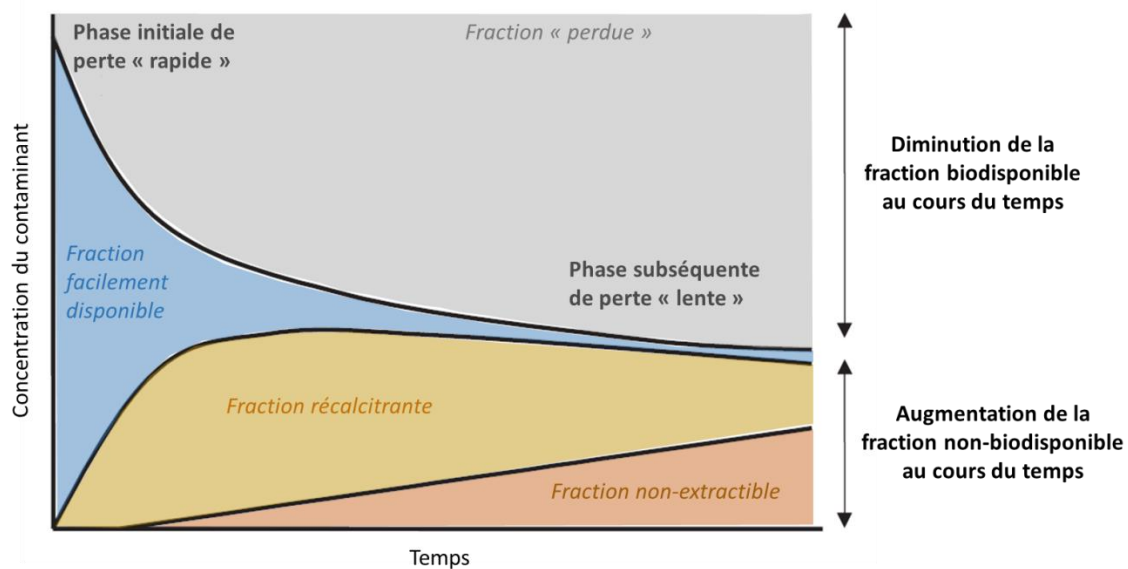


Figure 16. Changement de la biodisponibilité des composés organiques avec l'augmentation du temps de contact entre le composé et le sol (Riding et al., 2013).

1.3.2. Biodisponibilité

La biodisponibilité des HAP dans le sol est influencée par leurs propriétés physico-chimiques ainsi que par de nombreux facteurs abiotiques qui sont propres au sol tels que la température, le pH, la teneur et la qualité de la matière organique ou encore la porosité. Néanmoins, la présence de plantes et de microorganismes vont également conduire à une modification de leur biodisponibilité (Figure 17).

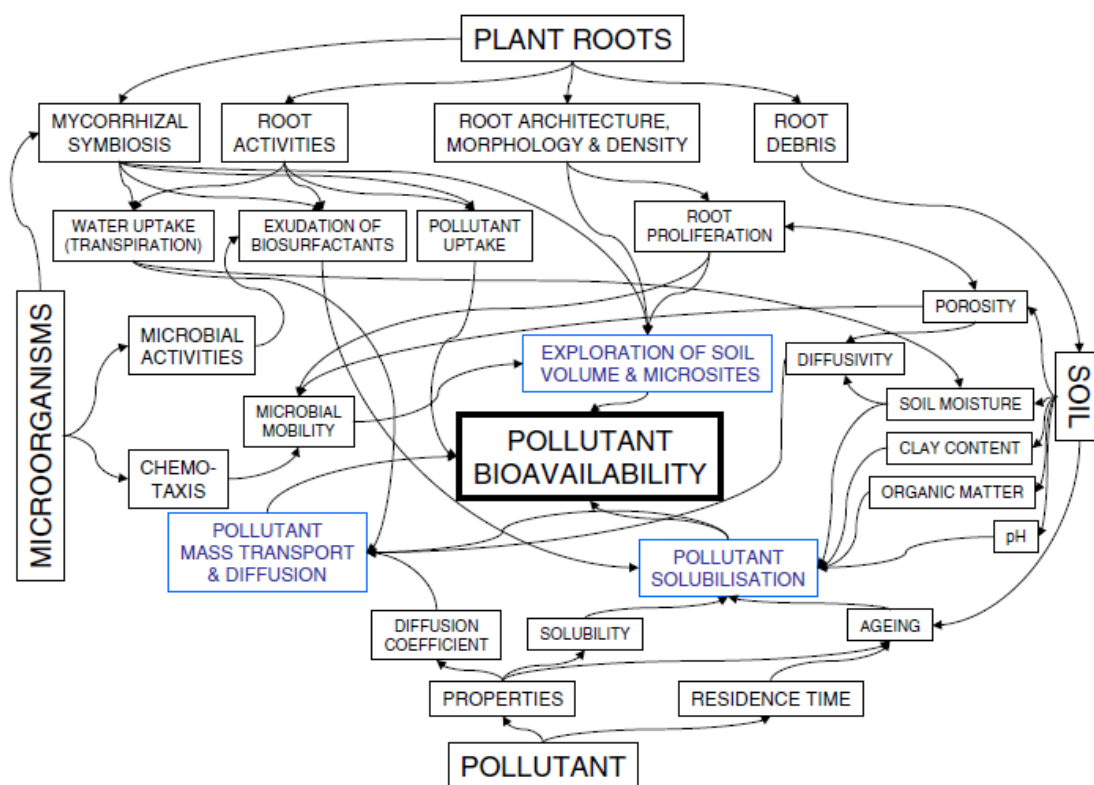


Figure 17. Influence de la plante, des microorganismes ainsi que des caractéristiques physico-chimiques du polluant et du sol sur la biodisponibilité des polluants organiques (Wenzel, 2009).

En présence de plantes, plusieurs phénomènes vont pouvoir être responsables de la modification de la biodisponibilité des HAP. Tout d'abord, en pénétrant dans le sol, les racines peuvent déstructurer les agrégats (Materechera *et al.*, 1994) ce qui va augmenter la surface d'échange entre la solution du sol et la fraction solide, favorisant ainsi la biodisponibilité des polluants. En revanche, cette pénétration peut également induire une compaction du sol (Bruand *et al.*, 1996) conduisant à une augmentation de la séquestration des composés et donc à diminution de leur biodisponibilité. Aussi, les HAP dont le $\log K_{ow}$ est supérieur à 3-3,5 vont pouvoir se sorber aux racines (Fismes *et al.*, 2002; Kipopoulou *et al.*, 1999; Wild and Jones, 1992a). La plante va également modifier le pH dans la rhizosphère (Hinsinger *et al.*, 2003), qui est le volume de sol directement en contact avec les racines, en l'augmentant ou en le diminuant selon les ions qui sont excrétés. Or, comme cela a été expliqué dans le paragraphe précédent, l'adsorption des HAP peut augmenter lorsque le pH est faible. Les racines vont aussi apporter du carbone organique qui va d'une part, augmenter la teneur en matière organique du sol (Angers and Caron, 1998) et donc la sorption des HAP, et d'autre part, stimuler les microorganismes du sol qui eux aussi vont

contribuer à la formation de matière organique (Ogawa *et al.*, 2001). De plus, la présence de mycorhizes, issues de l'association symbiotique entre un champignon et les racines, induirait un apport de matière organique encore plus important dans la rhizosphère (Quintero-Ramos *et al.*, 1993). En effet, certaines études ont par exemple montré que l'exsudation racinaire était augmentée en présence de mycorhizes (Grayston *et al.*, 1997; Leyval and Berthelin, 1993). Une des hypothèses pour expliquer ce phénomène serait que les mycorhizes produisent des hormones qui augmentent la perméabilité racinaire (Bowen, 1994). Au contraire, l'étude de Graham et ses collaborateurs (1981) a montré que les champignons mycorhiziens diminuaient la perméabilité des racines en raison de l'amélioration de la nutrition phosphatée de la plante, conduisant alors à une réduction des quantités d'exsudats racinaires libérés dans la rhizosphère. Les racines vont également excréter des exsudats qui vont augmenter la désorption des HAP par une augmentation de la matière organique dissoute en solution et à une diminution de la matière organique solide (Gao *et al.*, 2010). Ceci serait principalement due à des acides organiques de faible poids moléculaire comme l'acide citrique, l'acide malique ou l'acide oxalique (Gao *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2013) qui vont dissoudre une partie de la matière organique du sol en solution (Kong *et al.*, 2013) et perturber les associations organo-minérales de la fraction solide en produisant des complexes solubles (Jia *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2013). L'acide citrique est le composé présentant la plus forte action (Jia *et al.*, 2015; Ling *et al.*, 2009). Aussi, les racines vont sécréter des surfactants comme la saponine et la lécithine qui vont solubiliser les HAP (Soeder *et al.*, 1996) et donc augmenter leur biodisponibilité, mais aussi des mucilages qui vont agir comme des biosurfactants (Sun *et al.*, 2015). Une modification de la biodisponibilité des HAP va aussi se produire lorsque la plante va prélever de l'eau, puisque cela va induire un débit massique des HAP vers les racines (Liste and Alexander, 2000). Les polluants vont alors pouvoir s'adsorber aux racines et/ou à la matière organique de la rhizosphère.

En ce qui concerne les microorganismes, ils vont également pouvoir produire des surfactants tels que l'alsan et les rhamnolipides ce qui va permettre d'améliorer la biodisponibilité des polluants (Barkay *et al.*, 1999; Gu and Chang, 2001; Zhang *et al.*, 1997). En dégradant la matière organique (Iii, 1980; Jannasch *et al.*, 1971; Tran *et al.*, 2015), les microorganismes vont également augmenter la biodisponibilité des HAP en remobilisant les polluants qui

étaient séquestrés. Aussi, entre les HAP et les bactéries, il peut exister un phénomène de chimiotactisme, faisant déplacer les microorganismes vers les polluants (Ortega-Calvo *et al.*, 2003), ceux-ci devenant alors biodisponibles pour les bactéries. Chez les champignons, une sorption des HAP peut avoir lieu car ils vont pouvoir être adsorber sur les parois cellulaires ou pénétrer dans les cellules pour être stockés sous forme de vésicules (Verdin *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2009). Dans le cas de plantes mycorhizée, les biofilms formés autour des hyphes du champignon peuvent agir comme un vecteur rendant les bactéries plus labiles (Bianciotto *et al.*, 1996; Nurmiaho-Lassila *et al.*, 1997). Ceci pourrait alors aussi favoriser le déplacement des bactéries vers les polluants.

1.3.3. Dissipation

Une fois dans le sol, en plus de leurs différentes mobilités, les HAP vont connaître une dissipation selon plusieurs processus. A partir de mécanismes abiotiques ou biotiques, ils vont pouvoir être transférés dans les autres compartiments de l'environnement comme l'atmosphère ou les eaux souterraines, mais aussi être directement dissipés dans le sol.

1.3.3.1. Voies abiotiques

Dans les sols, la dissipation abiotique des HAP est responsable de 2 à 20 % des composés à 2 et 3 cycles (Park *et al.*, 1990) et concerne peu les molécules de haut poids moléculaire. D'une manière générale, comparé aux mécanismes biotiques, l'ensemble des processus abiotiques ne représente qu'une faible part dans la dissipation des HAP.

1.3.3.1.1. Volatilisation

La volatilisation des polluants vers l'atmosphère est négligeable pour les composés de haut poids moléculaire (Cousins and Jones, 1998) puisqu'ils sont peu volatils. Cependant ce phénomène n'est pas seulement fonction des propriétés physico-chimiques des HAP, mais aussi de celles du sol comme son potentiel rédox (Cabrerizo *et al.*, 2011), ou encore de celles de l'atmosphère extérieure telles que sa température (Cabrerizo *et al.*, 2011; Ophoff *et al.*, 1996). En effet, l'étude de Leduc et ses collaborateurs (1992) a montré une volatilisation plus

importante de l'acénaphthylène, de l'acénaphène, du fluorène et de l'anthracène en conditions aérobies plutôt que dénitrifiantes. De plus, aucune volatilisation n'a été observée pour ces quatre HAP en conditions sulfato-réductrices et méthanogènes. En ce qui concerne l'air extérieur, une volatilisation plus élevée du fluoranthène a été observée avec une augmentation de la température (Wolters *et al.*, 2002).

1.3.3.1.2. Photodégradation

La dissipation des HAP par photodégradation est assez faible dans les sols puisque la luminosité est limitée (Matsuzawa *et al.*, 2001). Elle est plus importante lors d'un fort ensoleillement (température élevée) (Zhang *et al.*, 2010) et dans les premiers centimètres de la surface du sol (Matsuzawa *et al.*, 2001). La photodégradation peut être caractérisée par une photolyse, c'est-à-dire par une action directe, physique, des rayons ultraviolets ou par une photo-oxydation, conduisant à la formation d'espèces réactives oxygénées (Thion, 2012).

1.3.3.1.3. Lixiviation/lessivage

Si les composés sont solubilisés (notamment les HAP légers) dans la solution du sol, ils peuvent être dissipés par lixiviation vers les eaux souterraines. Lorsqu'ils sont associés à des particules de sol, il s'agit d'un phénomène de lessivage.

1.3.3.2. Voies biotiques

Les voies biotiques constituent le phénomène majeur de dissipation des HAP dans les sols notamment avec la biodégradation par les microorganismes.

1.3.3.2.1. Dégradation par les voies bactérienne et fongique

La dégradation des HAP dans les sols s'effectue principalement par des bactéries ou des champignons hétérotrophes qui utilisent les composés comme source de carbone et d'énergie (Girard *et al.*, 2005). La dégradation consiste à transformer le polluant en

composés intermédiaires appelés métabolites (qui peuvent être plus ou moins toxiques que la molécule d'origine) et à aboutir à la formation de dioxyde de carbone et d'eau. Lorsque les produits finaux sont atteints, le composé est alors minéralisé. La dégradation peut avoir lieu en conditions anaérobies ou aérobies.

En anaérobiose, la dégradation est réalisée en conditions dénitrifiantes, sulfato-réductrices ou méthanogènes (Girard *et al.*, 2005). Cependant, les taux de dégradation sont plus faibles qu'en aérobiose et les voies métaboliques sont peu décrites (Girard *et al.*, 2005; Löser *et al.*, 1998). La plupart des données résultent d'expériences conduites avec des consortia bactériens (Ambrosoli *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2002; Davidova *et al.*, 2007; Dou *et al.*, 2009; Rockne and Strand, 2001; Zhang and Young, 1997). Néanmoins, deux souches bactériennes appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Vibrio* ont pu être identifiées comme étant capables de dégrader le naphthalène en conditions dénitrifiantes (Rockne *et al.*, 2000). D'ailleurs, le naphthalène est un des rares HAP où les voies de dégradation ont été décrites en détail. Celui-ci peut être dégradé sous conditions sulfato-réductrices et dénitrifiantes (Bregnard *et al.*, 1996; Coates *et al.*, 1996). La voie métabolique en conditions sulfato-réductrices est présentée en figure 18. L'étape initiale de dégradation correspond à une carboxylation aboutissant à la formation d'un acide 2-naphtoïque. Son cycle non substitué est réduit en premier par hydrogénation ce qui produit un composé avec un anneau cyclohexane. Un des métabolites de la voie de dégradation étant l'acide 2-carboxycyclohexylacétique, celui-ci est probablement généré par le clivage d'un fragment C_2 via une beta-oxydation d'un autre métabolite, un $C_{11}H_{16}O_4$ -diacide (Meckenstock *et al.*, 2004).

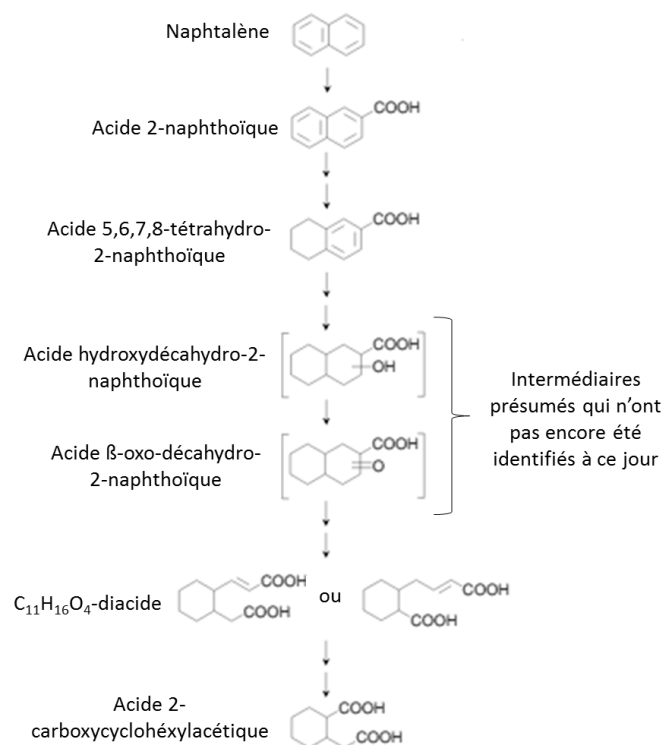


Figure 18. Voie anaérobie de dégradation du naphtalène en conditions sulfato-réductrices (Annweiler et al., 2002).

En conditions aérobies, les HAP sont initialement métabolisés par une réaction d'oxydation selon trois mécanismes (Figure 19).

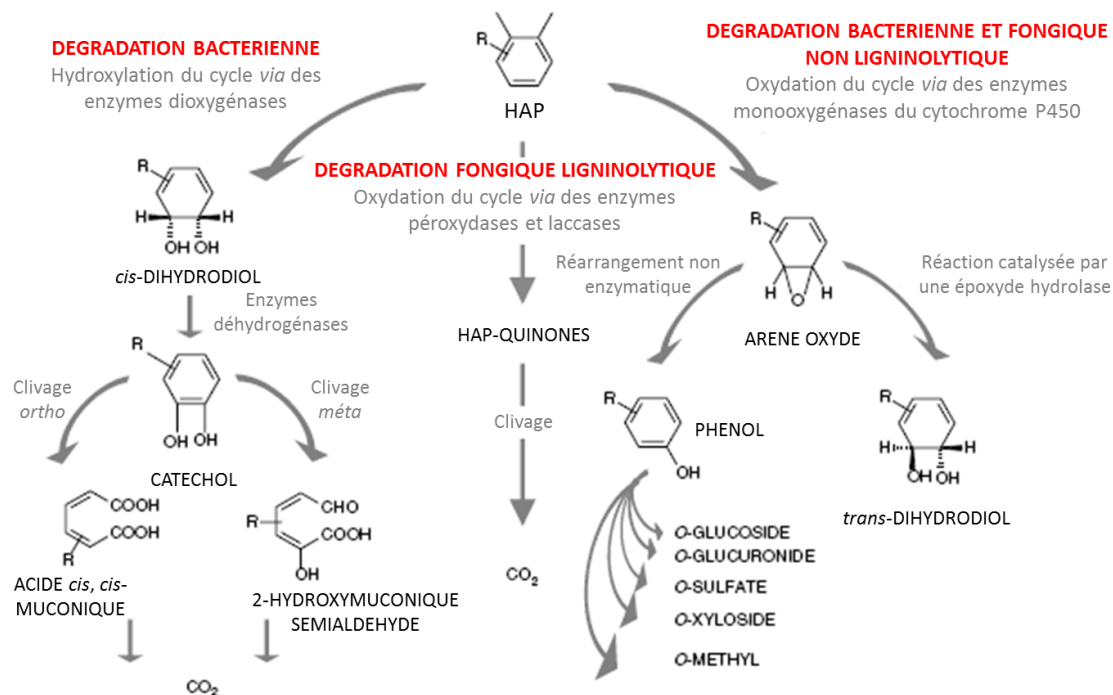


Figure 19. Les trois principales voies de dégradation des HAP par les bactéries et les champignons (Bamforth and Singleton, 2005).

Chez les bactéries, l'oxydation initiale implique des enzymes de la famille des dioxygénases ou des monooxygénases du cytochrome P450.

Les dioxygénases vont permettre l'incorporation de deux atomes d'oxygène sur l'un des cycles pour aboutir à la formation d'un *cis*-dihydrodiol qui sera par la suite, converti en catéchol. Des clivages selon la voie *ortho* (clivage entre les carbones porteurs des groupements hydroxyles) ou *méta* (clivage entre les carbones adjacents au diol) du catéchol vont conduire à la formation de produits aliphatiques qui pourront ensuite être acheminés dans le métabolisme central, comme par exemple, le cycle de Krebs. Une fois que le cycle aromatique hydroxylé initial sera dégradé, le deuxième cycle sera attaqué de la même manière (Doyle *et al.*, 2008). De nombreuses souches bactériennes sont capables de dégrader les HAP (Tableau 11).

Tableau 11. Exemples de bactéries dégradant les HAP (adapté de Juhasz and Naidu, 2000; Seo *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2006).

Bactéries	HAP
<i>Acidovorax delafieldii</i>	Phénanthrène
<i>Acinetobacter</i> sp.	Phénanthrène
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Anthracène, chrysène, fluoranthène, naphtalène, phénanthrène, pyrène
<i>Agrobacterium</i> sp.	Benzo(a)anthracène, chrysène, phénanthrène
<i>Alcaligenes</i> sp.	Naphtalène, phénanthrène
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	Fluoranthène, naphtalène
<i>Alcaligenes eutrophus/paradoxus</i>	Acénaphène
<i>Arthrobacter</i> sp	Anthracène, fluorène, phénanthrène
<i>Arthrobacter sulfureus/</i> <i>polychromogenes</i>	Phénanthrène
<i>Bacillus</i> sp.	Benzo(a)anthracène, chrysène, naphtalène, phénanthrène, pyrène
<i>Bacillus cereus</i>	Naphtalène, pyrène
<i>Beijerinckia</i> sp.	Phénanthrène
<i>Brevibacterium</i> sp.	Fluorène, phénanthrène
<i>Burkholderia</i> sp.	Benzo(a)anthracène, chrysène, coronène, dibenzo(ah)anthracène, fluoranthène, phénanthrène, pyrène
<i>Burkholderia cepacia</i>	Acénaphène, naphtalène, phénanthrène, pyrène
<i>Burkholderia cocovenenans</i>	Phénanthrène
<i>Comamonas testosteroni</i>	Anthracène, naphtalène, phénanthrène
<i>Corynebacterium renale</i>	Naphtalène
<i>Cycloclasticus</i> sp.	Acénaphène, benzo(a)anthracène, chrysène fluoranthène, naphtalène, phénanthrène, pyrène
<i>Flavobacterium</i> sp.	Anthracène, benzo(a)anthracène, chrysène, fluoranthène, phénanthrène, pyrène
<i>Gordonia</i> sp.	Chrysène, fluoranthène, pyrène
<i>Janibacter</i> sp.	Anthracène, fluorène, phénanthrène
<i>Micrococcus</i> sp.	Phénanthrène
<i>Moraxella</i> sp.	Naphtalène
<i>Mycobacterium</i> sp.	Anthracène, benzo(a)anthracène, benzo(a)pyrène, chrysène, fluoranthène, fluorène, naphtalène, phénanthrène, pyrène
<i>Mycobacterium flavescens</i>	Fluoranthène, pyrène

Bactéries (suite)	HAP (suite)
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	Phénanthrène, pyrène
<i>Nocardia</i> sp.	Phénanthrène
<i>Pasteurella</i> sp.	Fluoranthène
<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	Naphtalène
<i>Pseudomonas</i> sp.	Acénaphthène, benzo(a)anthracène, chrysène, fluoranthène, fluorène, naphtalène, phénanthrène
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Phénanthrène
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Acénaphthène, benzo(a)anthracène, chrysène, naphtalène, phénanthrène
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	Phénanthrène
<i>Pseudomonas putida</i>	Acénaphthène, anthracène, benzo(a)anthracène, fluoranthène, naphtalène, phénanthrène, pyrène
<i>Pseudomonas saccharophila/stutzeri</i>	Naphtalène, phénanthrène, pyrène
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	Fluorène
<i>Ralstonia</i> sp.	Naphtalène
<i>Rhodanobacter</i> sp.	Benzo(a)pyrène
<i>Rhodococcus</i> sp.	Anthracène, chrysène, fluoranthène, naphthalène, phénanthrène, pyrène
<i>Sphingomonas</i> sp.	Anthracène, benzo(a)anthracène, chrysène, fluoranthène, fluorène, naphtalène, phénanthrène, pyrène
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Anthracène, benzo(a)anthracène, chrysène, dibenzo(ah)anthracène, fluoranthène, naphtalène, phénanthrène, pyrène
<i>Sphingomonas yanoikuyae</i>	Anthracène, benzo(a)pyrène, phénanthrène, pyrène
<i>Staphylococcus</i> sp.	Phénanthrène
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Benzo(a)anthracène, chrysène, dibenzo(ah)anthracène, fluoranthène, pyrène
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Benzo(a)anthracène, benzo(a)pyrène, chrysène, dibenzo(ah)anthracène, fluoranthène, phénanthrène, pyrène
<i>Streptomyces</i> sp.	Naphtalène, phénanthrène
<i>Terrabacter</i> sp.	Fluorène
<i>Vibrio</i> sp.	Naphtalène, phénanthrène
<i>Xanthomonas</i> sp.	Benzo(a)pyrène, pyrène

Les bactéries appartenant aux genres *Sphingomonas*, *Pseudomonas* ou encore *Mycobacterium* ont été très étudiées et il a été démontré qu'elles étaient capables de métaboliser un grand nombre de HAP tels que le pyrène, le phénanthrène, le fluoranthène ou encore le naphtalène (Zhang *et al.*, 2006). La plupart des études concernent la dégradation de HAP à faible poids moléculaire et peu de bactéries ont été isolées comme étant capables de métaboliser les HAP à plus de 4 cycles (Doyle *et al.*, 2008). Il s'agirait principalement de bactéries de type Gram positif telles que les actinomycètes appartenant aux genres *Mycobacterium* ou *Rhodococcus* (Bonnard, 2010). En effet, il a été démontré que les souches *Mycobacterium* sp. RJGII-135 et *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 étaient capables de dégrader le benzo(a)anthracène et le benzo(a)pyrène, des HAP à haut poids moléculaire (Moody *et al.*, 2004, 2005; Schneider *et al.*, 1996). Comme ces HAP possèdent un grand nombre de cycles, ils sont plus résistants et leur dégradation est plus lente. Celle-ci peut être plus rapide lorsqu'elle est réalisée par un consortium bactérien. Le consortium

permet de minéraliser rapidement les métabolites secondaires par des bactéries qui ne sont à priori pas dégradantes mais qui possèdent d'autres capacités enzymatiques (Corgié, 2004) et d'accès aux polluants (Friedrich *et al.*, 2000). De plus, les HAP à haut poids moléculaire sont souvent métabolisés par co-métabolisme (Girard *et al.*, 2005). Le polluant n'est pas utilisé comme substrat de croissance par les microorganismes mais il est dégradé indirectement lors du métabolisme d'un autre substrat de structure similaire qui est utilisé comme source de croissance. C'est le cas par exemple du benzo(a)pyrène qui est dégradé par co-métabolisme *via* la dégradation du pyrène (Boonchan *et al.*, 2000).

Quelques bactéries sont également capables d'oxyder les HAP par l'action de l'enzyme monooxygénase du cytochrome P450 qui consiste à incorporer un atome d'oxygène sur l'un des cycles pour former un *trans*-dihydrodiol (Maigari and Maigari, 2015). Ceci est le cas par exemple du genre *Mycobacterium* (Brezna *et al.*, 2005; Kelley *et al.*, 1990). Ces mécanismes restent cependant mineurs par rapport à l'activité des enzymes dioxygénases (Maigari and Maigari, 2015).

Chez les champignons non ligninolytiques, la réaction d'oxydation implique également des enzymes de la famille des monooxygénases. Elles résultent en la production d'une arène oxyde qui est ensuite hydrolysée par une hydrolase époxyde en un *trans*-dihydrodiol. Des dérivés du phénol peuvent également être formés par le réarrangement non enzymatique de l'arène oxyde. Ceux-ci peuvent alors agir comme substrats pour une sulfatation ou une méthylation ultérieure, ou encore, pour une conjugaison avec du glucose, du xylose ou de l'acide glucuronique. Des exemples de champignons non ligninolytiques dégradant les HAP sont présentés dans le tableau 12. Le plus étudié des champignons est *Cunninghamella elegans* qui oxyde de nombreux HAP en phénol (Johnsen *et al.*, 2005). La métabolisation des HAP par des monooxygénases peut ensuite mobiliser les polluants pour des dégradations ultérieures par des bactéries. En effet, des co-cultures bactérie et champignon non ligninolytique, *Penicillium janthinelum* VUO 10,201, ont été capables de dégrader du chrysène, du benzo(a)anthracène, du dibenzo(a,h)anthracène et du benzo(a)pyrène (Boonchan *et al.*, 2000) alors que de plus faibles quantités de ces HAP avaient été dégradées lorsqu'ils étaient incubés soit avec le champignon, soit avec la bactérie. La dégradation des HAP de haut poids moléculaire serait donc favorisée par l'action conjointe des champignons et des bactéries. Les HAP à faible poids moléculaire peuvent être dégradés par *Aspergillus*

sp., *Trichocladium canadense* et *Fusarium oxysporum* (Haritash and Kaushik, 2009) et les HAP à haut poids moléculaire par *Trichocladium canadense*, *Aspergillus* sp., *Verticillium* sp. et *Acremonium* sp. (Haritash and Kaushik, 2009).

Chez les champignons ligninolytiques, la métabolisation des HAP est initiée par des enzymes extracellulaires impliquées dans la dégradation de la lignine (Figure 20) : des peroxydases et des laccases (Maigari and Maigari, 2015). Ces enzymes sont induites directement par les substrats ligno-cellulosiques (Hofrichter, 2002; Martínez, 2002) et sont peu spécifiques (Girard *et al.*, 2005). Ainsi, puisque les HAP possèdent des analogies moléculaires avec la lignine (Bezalel *et al.*, 1996; Garon *et al.*, 2000), ils vont pouvoir être dégradés par ces mêmes enzymes. D'une manière générale, les champignons dégradent alors les HAP par co-métabolisme (Peng *et al.*, 2008). L'attaque de l'un des noyaux aromatiques va libérer un composé hydroxylé, qui va conduire à la formation de quinones par oxydation radicalaire.

La biotransformation de la lignine est principalement possible grâce aux champignons saprotrophes basidiomycètes de la pourriture blanche puisqu'ils s'avèrent très efficaces (Dashtban *et al.*, 2010). Des exemples de ces champignons, capables de dégrader les HAP, sont donnés dans le tableau 12. La souche *Phanerochaete chrysosporium* est la plus étudiée pour la production d'enzymes ligninolytiques et la dégradation de xénobiotiques (Silva *et al.*, 2010). Par rapport aux bactéries, les champignons ont plus de capacité à dégrader les HAP de haut poids moléculaire et plus généralement les HAP faiblement biodisponibles (Bonnard, 2010). En effet, l'attaque initiale des HAP par les exoenzymes fongiques est plus probable que l'attaque par les enzymes intracellulaires des bactéries. Les exoenzymes fongiques ont l'avantage de pouvoir diffuser au plus immobile des HAP alors que les dioxygénases des bactéries sont généralement liées à la cellule car elles requièrent du NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) comme cofacteur (Johnsen *et al.*, 2005).

Sous l'action de l'ensemble des enzymes ligninolytiques, la métabolisation initiale des HAP conduit souvent à la formation de métabolites plus hydrosolubles et plus réactifs chimiquement que le composé initial (Doyle *et al.*, 2008). Ainsi, ils sont potentiellement plus biodégradables par les bactéries indigènes (Doyle *et al.*, 2008) notamment grâce à la présence d'un groupe réactif (quinone) qui facilite l'attaque des cycles par les systèmes enzymatiques bactériens (Gramss *et al.*, 1999b; Kotterman *et al.*, 1998). Ceci est le cas par exemple du champignon ligninolytique *Bjerkandera* sp. BOS55 (Kotterman *et al.*, 1998).

Cependant, lorsque les quinones ne sont pas minéralisées par des réactions enzymatiques ultérieures (par la même souche fongique ou par un autre microorganisme) ces métabolites sont susceptibles de s'accumuler et sont donc considérés comme produits « dead end » (Bezalel *et al.*, 1996; Field *et al.*, 1992).

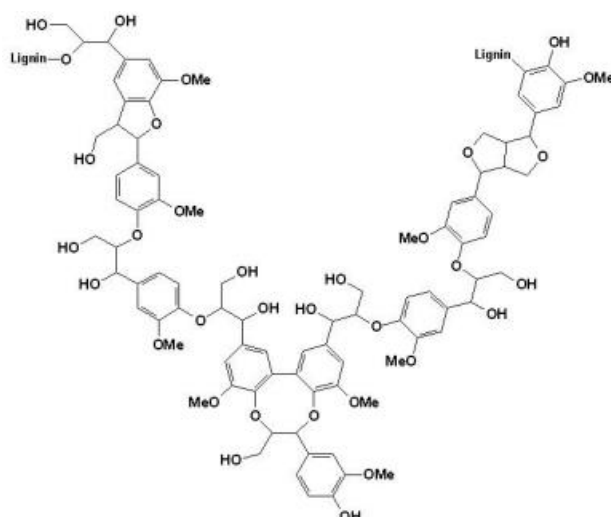


Figure 20. Structure moléculaire d'une lignine (Wertz, 2010).

Tableau 12. Exemples de champignons dégradant les HAP (adapté de Doyle *et al.*, 2008; Juhasz and Naidu, 2000; Zhang *et al.*, 2006).

	Champignons	HAP
Non-ligninolytiques	<i>Aspergillus</i> sp.	Phénanthrène, pyrène
	<i>Aspergillus niger</i>	Naphtalène, Phénanthrène
	<i>Aspergillus terreus</i>	Fluoranthène
	<i>Candida</i> sp.	Phénanthrène
	<i>Candida utilis</i>	Naphtalène
	<i>Cladosporium</i> sp.	Benzo(a)pyrène
	<i>Cladosporium herbarum</i>	Anthracène
	<i>Cunninghamella</i> sp.	Phénanthrène, pyrène
		Acénaphène, anthracène,
	<i>Cunninghamella elegans</i>	benzo(a)anthracène,
		fluoranthène, naphtalène,
		phénanthrène, pyrène
	<i>Fusarium moniliforme</i>	Anthracène
	<i>Penicillium</i> sp.	Chrysène, pyrène
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Naphtalène
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Anthracène, fluoranthène
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Naphtalène
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Naphtalène

	Champignons (<i>suite</i>)	HAP (<i>suite</i>)
Non-ligninolytiques	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Phénanthrène
	<i>Saccharomyces</i> sp.	Acénaphène, anthracène, chrysène, fluoranthène, fluorène, phénanthrène, pyrène
	<i>Syncephalastrum</i> sp.	Phénanthrène
	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Chrysène, naphthalène, phénanthrène, pyrène
Ligninolytiques	<i>Bjerkandera</i> sp.	Anthracène
	<i>Bjerkandera adjusta</i>	Anthracène, fluoranthène, phénanthrène, pyrène
	<i>Phanerochaete</i> sp.	Presque tous les HAP
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Anthracène, phénanthrène, pyrène
	<i>Pleurotus</i> sp.	Fluoranthène, phénanthrène, pyrène
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Anthracène, fluoranthène, phénanthrène

Parmi cette microflore, des phénomènes de compétition pour les nutriments peuvent avoir lieu (Hibbing *et al.*, 2010) et limiter l'activité de certains microorganismes, impactant alors la dégradation des polluants. De plus, en présence de plusieurs HAP, ce qui est généralement le cas dans l'environnement, certains peuvent avoir un effet inhibiteur vis-à-vis de la dégradation d'autres composés (Girard 2005). Par exemple, dans l'étude de McNally et ses collaborateurs (1999), la présence de phénanthrène a inhibé la dégradation du pyrène. Ceci peut s'expliquer par la toxicité du polluant en lui-même (Bouchez *et al.*, 1995) ou par la production de métabolites de dégradation plus toxiques que la molécule initiale (Juhász *et al.*, 2002). Au contraire, comme cela a déjà été évoqué précédemment, la présence de certains polluants peuvent stimuler la dégradation d'autres composés (co-métabolisme) comme dans l'étude de McNally et ses collaborateurs (1999) où la présence de naphthalène a stimulé la dégradation du phénanthrène et du pyrène.

1.3.3.2.2. Dégradation dans la rhizosphère

Le terme « rhizosphère » a été employé pour la première fois en 1904 par Lorenz Hiltner pour définir le volume de sol influencé par les racines d'une plante (Hartmann *et al.*, 2008). Il existe cependant plusieurs définitions comme celle selon laquelle la rhizosphère est divisée

en trois zones (Figure 21) : l'endorhizosphère qui comprend des parties du cortex et de l'endoderme, le rhizoplan qui est la zone médiane directement adjacente à la racine comprenant l'épiderme racinaire et le mucilage et enfin, l'ectorhizosphère qui est la zone la plus extérieure, allant du rhizoplan au sol non rhizosphérique (McNear Jr., 2013). Dans ce manuscrit de thèse, la définition de Hiltner sera utilisée pour désigner la rhizosphère.

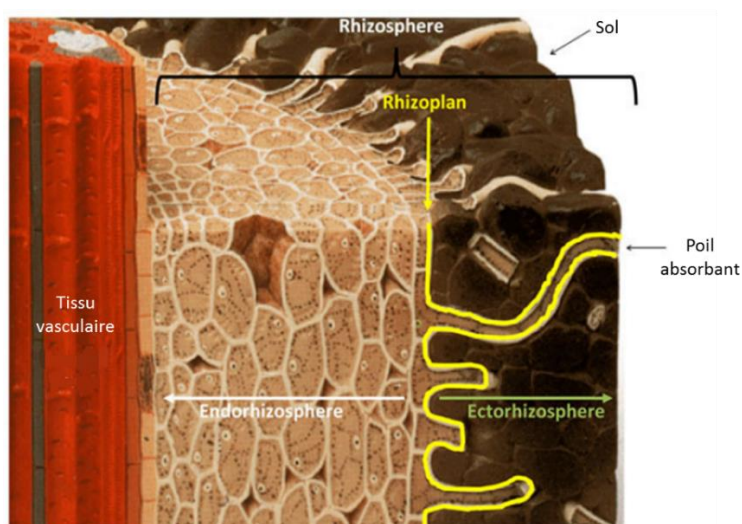


Figure 21. Représentation d'une coupe racinaire montrant la structure de la rhizosphère (McNear Jr., 2013).

Dans le sol, les racines vont libérer de nombreux composés appelés rhizodépôts qui comprennent (Figure 22) :

- des mucilages qui sont composés de sucres polymérisés, représentés majoritairement par de l'arabinose, du galactose, du fucose, du glucose et du xylose, chez le maïs (Bacic *et al.*, 1987) et le pois (Knee *et al.*, 2001), ainsi que des protéines, retrouvées jusqu'à 6 % chez le maïs (Bacic *et al.*, 1987). Ces composés de haut poids moléculaire sont sécrétés de façon active (Drénou, 2006) par plusieurs zones de la racine comme la zone des poils absorbants (Gobat *et al.*, 2010; Werker and Kislev, 1978) mais ils restent majoritairement sécrétés par les cellules de la couche externe de la coiffe (Gobat *et al.*, 2010; Guckert *et al.*, 1975; Paull and Jones, 1975). Les mucilages, qui jouent un rôle de lubrifiant pour la pénétration des racines dans le sol, peuvent représenter 2 à 12 % des rhizodépôts totaux (Dennis *et al.*, 2010). La microflore rhizosphérique qui va métaboliser les mucilages végétaux vont également

produire d'autres polysaccharides ce qui va former un mélange de mucilage végétale et microbien, appelé mucigel (Gobat *et al.*, 2010) ;

- des cellules détachées provenant essentiellement de la coiffe (Gobat *et al.*, 2010; McNear Jr., 2013; Nguyen, 2003). La desquamation de ces cellules se produit par abrasion lors de l'avancement de l'apex racinaire dans le sol (Drénou, 2006). Celles-ci se détachent afin de protéger l'apex en réduisant les forces de frottement qui pourraient endommager la racine (Bengough and McKenzie, 1997). Laissées en arrière au cours de la croissance racinaire (Gobat *et al.*, 2010), les cellules survivent un certain temps dans le sol, pouvant encore sécréter des enzymes, des protéines et du mucilage (Gobat *et al.*, 2010; McNear Jr., 2013; Vermeer and McCully, 1982). Elles finissent ensuite par être colonisées et lysées par les microorganismes (Gobat *et al.*, 2010), créant ainsi des hotspots de substrat dans la rhizosphère pouvant représenter 10 % du carbone total libéré par les racines (Iijima *et al.*, 2000) ;
- des lysats provenant de l'autolyse des cellules sénescents des tissus rhizodermiques et corticaux (Gobat *et al.*, 2010) et de l'ensemble de la racine à la mort de la plante (Lynch and Whipps, 1991) ;
- des exsudats qui sont des composés solubles de faible poids moléculaires comme des sucres, des acides aminés, des acides organiques, des acides gras, des hormones et des vitamines (Drénou, 2006; Lynch and Whipps, 1991). La diffusion des exsudats est passive et s'effectue au niveau de la zone méristématique de la racine, juste derrière la coiffe (Darwent *et al.*, 2003; Farrar *et al.*, 2003; Jaeger *et al.*, 1999; Van Egeraat, 1975). 5 à 21 % du carbone fixé photosynthétiquement par les plantes sont libérés *via* la racine comme des sucres, des acides aminés et des métabolites secondaires (Huang *et al.*, 2014).

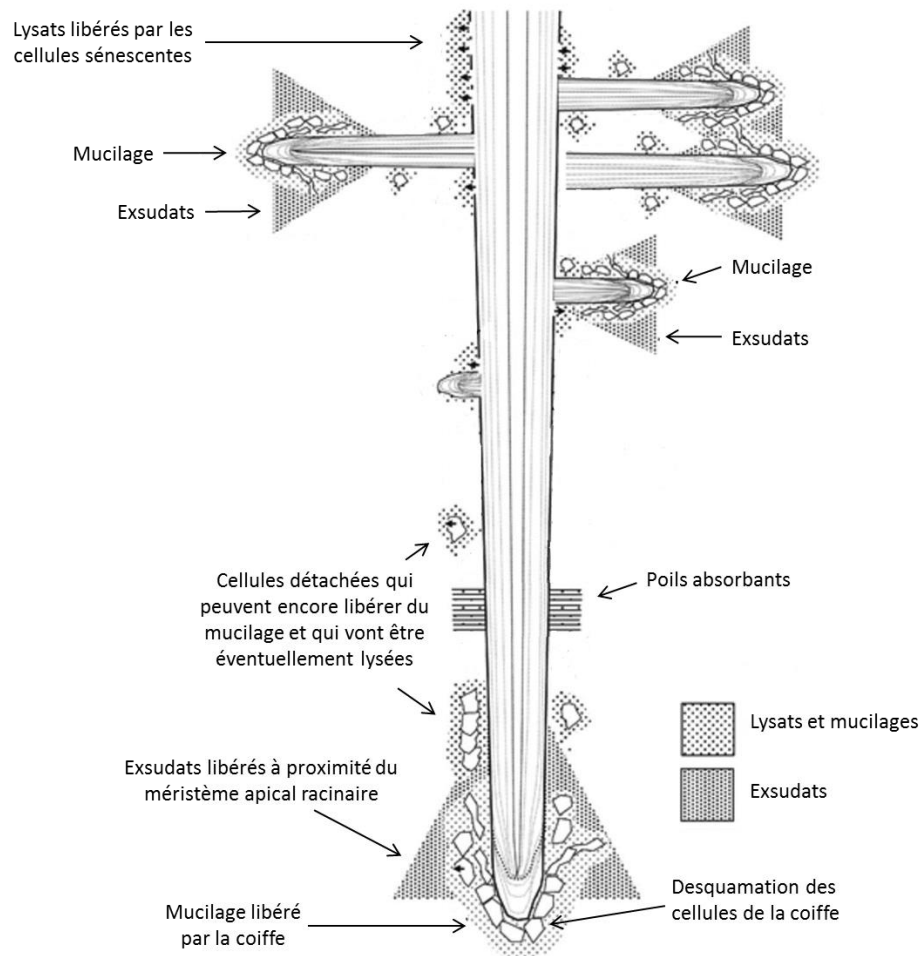


Figure 22. Origines des rhizodépôts (adapté de Dennis *et al.*, 2010).

La composition et la concentration de ces composés vont différer selon l'espèce végétale et son statut physiologique, ainsi que selon les conditions physico-chimiques du sol. En effet, il a été démontré que les racines de blé, de pois, de luzerne et d'amarante réfléchiaient exsudaient majoritairement des carbohydrates et des acides organiques avec très peu d'acides aminés, alors que celles du radis et du chénopode blanc exsudaient principalement des acides organiques et des acides aminés (Merbach *et al.*, 1999). Nardi et ses collaborateurs (2002) ont montré que la composition en molécules exsudées pouvait également différer selon la variété d'une même espèce végétale, la composition en acides organiques étant différente selon la variété de maïs (Mytos ou Samantha). Les quantités exsudées vont aussi varier selon l'âge de la plante. En effet, une exsudation plus importante a été observée chez la tomate, le trèfle souterrain et le phalaris au cours de leurs deux premières semaines de croissance plutôt que dans les deux semaines suivantes (Rovira, 1959). Lorsque la plante est en condition de stress en raison d'une déficience en nutriment

dans le sol, celle-ci va également modifier sa concentration en exsudats. Par exemple, une augmentation du taux d'acides carboxyliques émis dans la rhizosphère a été observée pour le pois chiche lors d'une déficience en fer (Ohwaki and Sugahara, 1997) et une augmentation de la teneur en acides organiques pour le colza a été identifiée lors d'une déficience en phosphore (Hoffland, 1992). Le stress dû à la présence de polluant dans le sol comme les HAP va aussi induire une modification de l'exsudation racinaire. L'étude de Muratova et ses collaborateurs (2009a) a montré que la présence de phénanthrène à une concentration de 10 mg.kg⁻¹ conduisait à une stimulation de la libération de carbohydrates chez le sorgo commun, alors qu'à une concentration de 100 mg.kg⁻¹ il induisait une diminution de la teneur en acides carboxyliques, carbohydrate et acides aminés. Le pH du sol va aussi influencer l'exsudation des espèces végétales, comme chez le ray-grass, où l'augmentation de la teneur en carbone rejetée dans la rhizosphère a été corrélée avec l'augmentation du pH (Meharg and Killham, 1990).

Les rhizodépôts représentent une source importante de carbone et d'énergie qui va pouvoir être assimilée par les microorganismes de la rhizosphère. Ceci va conduire à une stimulation de leur croissance et de leur activité (Baudoin *et al.*, 2003) avec une densité 1 à 4 fois plus importante que dans un sol non végétalisé (Gaskin, 2008). D'après Gerhardt et ses collaborateurs (2009), sur la base d'un gramme, le sol rhizosphérique posséderait 10 à 100 fois plus de microorganismes qu'un sol non planté. Pour les sols qui contiennent une grande quantité de racines, les populations microbiennes pourraient atteindre 10¹² cellules par gramme de sol (Gerhardt *et al.*, 2009). La plante va alors pouvoir influencer indirectement la dissipation des HAP *via* la stimulation des microorganismes capables de les dégrader (Liu *et al.*, 2014; Shahsavari *et al.*, 2015; Tejeda-Agredano *et al.*, 2013). Ceci constitue alors l'un des principaux **effets indirects de la plante** sur la dégradation des HAP dans la rhizosphère. Toutefois, la stimulation des microorganismes dégradants n'est pas toujours due à la présence de la plante. En effet, d'après l'étude de Binet et ses collaborateurs (2000a), le pourcentage de ces microorganismes par rapport à la microflore totale était le même que ce soit dans le sol rhizosphérique ou non rhizosphérique, suggérant qu'ils avaient plutôt été stimulés par la présence des HAP. Aussi, pendant la croissance des végétaux, les racines absorbent et réduisent les teneurs en nutriments minéraux biodisponibles tels que l'ammonium et le phosphate qui deviennent limitant pour la croissance et l'activité

microbienne (Jingguo and Bakken, 1997; Kaye and Hart, 1997; Moorhead *et al.*, 1998), impactant alors potentiellement les espèces dégradantes. En effet, il a été montré qu'un apport de nutriments minéraux dans des sols contaminés aux HAP résultait en une augmentation du taux de dégradation de ces molécules (Breedveld and Sparrevik, 2000; Kalantary *et al.*, 2014). La dégradation des contaminants peut également être influencée par certains composés racinaires présentant une structure similaire à celle des polluants ou de leurs métabolites de dégradation (Figure 23).

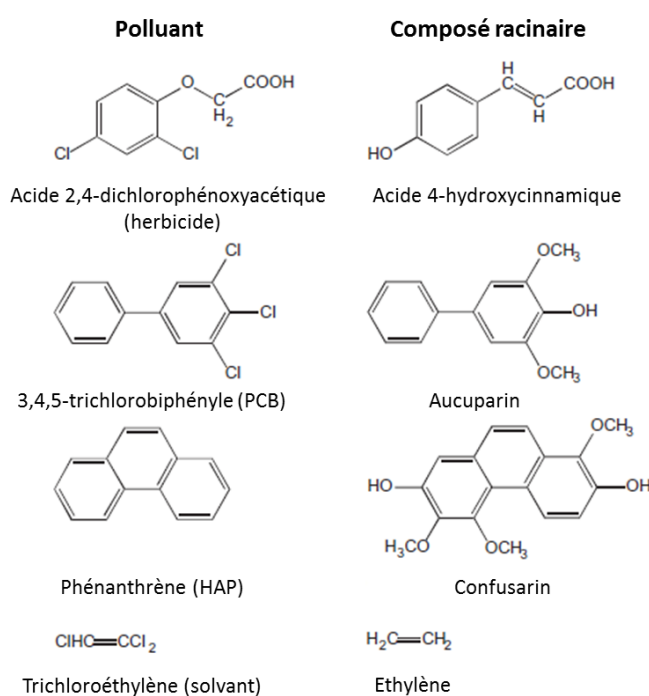


Figure 23. Similarité structurale entre les composés racinaires et les polluants organiques (Shaw *et al.*, 2006).

Ils vont alors agir soit comme un substrat de croissance pour les espèces microbiennes capables de dégrader le contaminant soit comme un inducteur de sa voie catabolique ou enfin comme un substrat pour sa dégradation co-métabolique (Shaw and Burns, 2003). Lorsque le composé racinaire agit comme un substrat de croissance, les enzymes produites pour le dégrader seront les mêmes que pour le polluant, ce qui suggère que la communauté microbienne dégradante est adaptée bien avant l'apparition de ce dernier (Shaw and Burns, 2003). Ainsi, quand le polluant sera présent, sa dégradation sera beaucoup plus rapide que dans le sol non rhizosphérique puisque les microorganismes mettront moins de temps à s'acclimater (Crowley *et al.*, 1996; Dunning Hotopp and Hausinger, 2001; Fang *et al.*, 2001).

Lorsque le composé racinaire intervient comme un inducteur, il va stimuler une réponse génétique chez les communautés microbiennes dégradantes en induisant des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation des HAP (Chen and Aitken, 1999; Ogunseitan *et al.*, 1991). Enfin, en ce qui concerne le co-métabolisme, les enzymes microbiennes impliquées dans la dégradation du composé racinaire qui sert de source de croissance, vont indirectement dégrader le polluant qui lui n'apporte aucune énergie supplémentaire ni bénéfice nutritif (Chen and Aitken, 1999; Gilbert and Crowley, 1997; Rentz *et al.*, 2005). Cependant, la définition de co-métabolisme n'est pas la même selon les auteurs. Par exemple, d'après Pelmont (1996), le polluant est incapable à lui seul d'assurer la croissance cellulaire car son apport en énergie et en carbone est insuffisant. La présence d'un substrat de croissance serait alors obligatoire pour accomplir la dégradation du polluant et fournir l'énergie et les nutriments nécessaires à la cellule. D'autres types de composés racinaires vont aussi pouvoir influencer la dégradation des HAP grâce à leur chimiotactisme. Ces molécules comme des sucres ou des acides aminés vont attirer des microorganismes (Heinrich and Hess, 1985; Pandya *et al.*, 1999; Zheng and Sinclair, 1996) dont certainement des espèces dégradantes qui vont alors se retrouver en présence du contaminant et le dégrader. Des transferts de gènes par conjugaison peuvent également avoir lieu entre les microorganismes. Ceci pourrait alors améliorer la dégradation des polluants puisque de nombreux gènes de dégradation des HAP se trouvent dans des plasmides (Obayori and Salam, 2010). De plus, selon plusieurs études, le transfert de gènes s'avère plus important dans le sol rhizosphérique que non rhizosphérique (Kroer *et al.*, 1998; Richaume *et al.*, 1992; Smit *et al.*, 1991; van Elsas *et al.*, 1988). Ceci serait dû à la stimulation de l'activité microbienne *via* les exsudats racinaires (Shaw and Burns, 2003; van Elsas *et al.*, 1988). En effet, l'échange génétique par conjugaison nécessite beaucoup de ressources pour la réplication de l'ADN et la formation du pilus²¹ (Fernandez-Astorga *et al.*, 1992; Muela *et al.*, 1994). Or, selon Kroer et ses collaborateurs (1998), l'augmentation de l'activité métabolique des cellules bactériennes ne stimule pas davantage la conjugaison tant que l'activité cellulaire est au-dessus d'un certain seuil. La stimulation serait alors plutôt due à une accumulation des bactéries au niveau de la rhizosphère, augmentant alors le contact entre les cellules et donc le transfert de gènes (Kroer *et al.*, 1998). Cet effet pourrait également

²¹ Appendice se trouvant à la surface de la paroi bactérienne permettant d'établir le contact entre les cellules et donc le transfert du plasmide. Ce dernier possède les gènes responsables de la synthèse du pilus.

s'expliquer par la présence de molécules signales émises par la plante lors de l'apparition d'une tumeur par exemple (Piper *et al.*, 1993). Aussi, la présence de mycorhizes va pouvoir conduire à une dissipation plus importante des HAP (Joner and Leyval, 2003). En effet, certains de ces champignons produisent des peroxydases et des laccases (Burke and Cairney, 2002; Gramss *et al.*, 1999a), des enzymes impliquées dans la dégradation des polluants. De plus, il a été montré que les mycorhizes accumulaient du peroxyde d'hydrogène au niveau des racines (Salzer *et al.*, 1999) et stimulaient l'expression d'enzymes peroxydases dans les racines et la rhizosphère (Criquet *et al.*, 2000), ce qui pourrait alors conduire à une augmentation de la dégradation des HAP au niveau des racines mycorhizées.

Des **effets directs de la plante** vont également être responsables de la dégradation des HAP dans la rhizosphère. Ceux-ci seront davantage développés dans la partie ultérieure « 1.4.4. Phytoremédiation ». La plante va tout d'abord pouvoir absorber le polluant par le flux de transpiration, le transloquer vers ses différents organes (phytoextraction), le dégrader (phytodégradation) ou le volatiliser (phytovolatilisation) (Shaw and Burns, 2003). Cependant, ce processus ne concerne que très peu de HAP du fait de leur faible solubilité. De manière générale, les composés dont le log K_{OW} est supérieur à 3,5 ne sont pas absorbés par la plante car ils ont certainement une affinité si forte avec le sol et la membrane lipidique des cellules racinaires qu'ils ne peuvent pas entrer dans le flux (Dietz and Schnoor, 2001). Aussi, les racines libèrent dans la rhizosphère des composés qui peuvent directement dégrader les polluants. Une étude de Kraus et ses collaborateurs (1999), a montré que l'enzyme peroxydase de soja était capable d'oxyder une grande variété de HAP. L'activité de cette enzyme peut être stimulée par leur présence (Criquet *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2008; Muratova *et al.*, 2009b). En effet, le contact entre la racine et le composé toxique induit l'activité de la peroxydase qui peut alors avoir une fonction intracellulaire dans le cadre d'un mécanisme de défense et/ou un effet direct sur la dégradation du toxique dans le milieu extérieur (Kraus *et al.*, 1999). Même après la mort de la plante, les enzymes peuvent toujours continuer à dégrader les molécules dans le sol (Liu *et al.*, 2014).

1.3.4. La dégradation du benzo(a)anthracène

De nombreux microorganismes sont capables de dégrader le BaA dont ceux présentés dans le tableau 13.

Tableau 13. Microorganismes capables de dégrader le benzo(a)anthracène.

	Microorganismes	Références
Bactérie	<i>Alcaligenes denitrificans</i> WW1	Weissenfels <i>et al.</i> , 1991
	<i>Beijerinckia</i> sp. B1	Mahaffey <i>et al.</i> , 1988
	<i>Beijerinckia</i> sp. B8/36 mutant	Jerina <i>et al.</i> , 1984
	<i>Burkholderia cepacia</i> VUN 10 001, VUN 10 002 et VUN 10 003	Juhasz <i>et al.</i> , 1997, 2000
	<i>Mycobacterium</i> sp. RJGII-135	Schneider <i>et al.</i> , 1996
	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	Moody <i>et al.</i> , 2005
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Caldini <i>et al.</i> , 1995
	<i>Pseudomonas saccharophila</i> P15	Chen and Aitken, 1999
	<i>Sphingomonas</i> sp. KK22	Kunihiro <i>et al.</i> , 2013
	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> EPA 505	Ye <i>et al.</i> , 1996
Champignon ligninolytique	<i>Fusarium solani</i> MAS2 et MBS1	Wu <i>et al.</i> , 2010
	<i>Irpex lacteus</i>	Cajthaml <i>et al.</i> , 2006
	<i>Phanerochaete laevis</i> HHB-1625	Bogan and Lamar, 1996
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Baldrian <i>et al.</i> , 2000; Rocha <i>et al.</i> , 2014
Champignon non-ligninolytique	<i>Byssosclamyces spectabilis</i>	Rosales <i>et al.</i> , 2012
	<i>Cunninghamella elegans</i>	Cerniglia <i>et al.</i> , 1994
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Rosales <i>et al.</i> , 2012

Les souches bactériennes *Burkholderia cepacia* VUN 10 001, VUN 10 002 et VUN 10 003 ainsi que les souches fongiques *Fusarium solani* MAS2 et MBS1 peuvent utiliser le BaA comme seule source de carbone (Juhasz *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2010) alors que la plupart des microorganismes en sont incapables. La dégradation du HAP est principalement possible par une préculture des souches microbiennes en présence d'un substrat inducteur comme le salicylate, le biphenyle ou encore le m-xylène (Chen and Aitken, 1999; Jerina *et al.*, 1984; Mahaffey *et al.*, 1988). Ces composés aromatiques permettent d'induire chez les microorganismes le système enzymatique nécessaire à l'oxydation du BaA. Des HAP peuvent également servir d'inducteurs dans la dégradation du BaA comme dans les études de Chen

et Aitken (1999) et Moody et ses collaborateurs (2005), ainsi que dans celle de Ye et ses collaborateurs (1996), où du phénanthrène et du fluoranthène ont été utilisés respectivement. La dégradation du BaA peut aussi être réalisée par co-métabolisme puisque la bactérie *Alcaligenes dinitrificans* WW1 n'est capable de le dégrader qu'en présence de fluoranthène (Weissenfels *et al.*, 1991). Toutes ces études ont analysé le métabolisme du BaA en présence des souches microbiennes alors que d'autres ont cloné et surexprimé des gènes codant des enzymes de dégradation des HAP présents chez certains microorganismes et ont exposé les cellules recombinantes avec du BaA. La bactérie *Sphingomonas* impliquée dans la dégradation de nombreux HAP est la plus étudiée pour ce type d'analyse. Les enzymes dioxygénase PhnI (Demanèche *et al.*, 2004; Jouanneau *et al.*, 2006) et déhydrogénase PDDH (Jouanneau and Meyer, 2006) provenant de la souche CHY-1 sont capables de dégrader le BaA. Les métabolites produits par PhnI sont ensuite convertis par PDDH (Jouanneau and Meyer, 2006). La dioxygénase PhnA1fA2f de la souche LH128 s'est montrée également capable d'oxyder le BaA (Schuler *et al.*, 2009). En ce qui concerne les champignons, l'enzyme laccase produite par *Ganoderma lucidum* Chaaime-001 BCU exposée directement avec du BaA a aussi la capacité de le dégrader (Punnapayak *et al.*, 2009).

Grâce aux études du catabolisme du BaA plusieurs métabolites ont pu être identifiés (Tableau 14) et des voies de dégradations ont pu être proposées (Figure 24). L'attaque initiale du HAP semble être réalisée préférentiellement aux positions 1,2 (Gibson *et al.*, 1975; Jouanneau *et al.*, 2006; Mahaffey *et al.*, 1988) et 10,11 (Jouanneau *et al.*, 2006; Moody *et al.*, 2005) par plusieurs bactéries. Cette première attaque conduit, par réaction d'hydroxylation, à la formation de composés dihydrodiols qui ont été identifiés chez la plupart des microorganismes. L'étude de Jouanneau et ses collaborateurs (2006) est la seule à montrer une double hydroxylation aux positions 1,2 et 10,11. Chez les champignons non-ligninolytiques, les dihydrodiols identifiés proviendraient certainement d'intermédiaires époxydes qui ont été métabolisés par une époxyde hydrolase. Pour les espèces ligninolytiques, l'attaque initiale du BaA par oxydation conduit au métabolite BaA-7,12-dione qui a également été identifié *via* la voie de dégradation de la bactérie *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (Moody *et al.*, 2005). Selon les espèces fongiques, différentes enzymes ligninolytiques vont être produites pour oxyder le BaA. Pour les souches *Fusarium solani* MAS2 et MBS1 seulement des laccases ont été identifiées (Wu *et al.*, 2010) alors que pour la

souche *Phanerochaete laevis* HHB-1625, un taux plus élevé de manganèse peroxydase que de laccase a été retrouvé (Bogan and Lamar, 1996). Aucune enzyme lignine peroxydase n'a été produite par ces deux espèces. Pour le champignon *Phanerochaete laevis* HHB-1625 ainsi que pour l'espèce *Irpex lacteus* (Cajthaml *et al.*, 2006), aucune accumulation de quinones n'a été observée. Ceci suggère qu'elles ont été métabolisées et ne sont donc pas considérées comme des produits « dead end ».

Tableau 14. Métabolites identifiés lors de la dégradation du benzo(a)anthracène par différents microorganismes. Les chiffres colorés correspondent aux molécules de la figure 24.

<i>Beijerinckia</i> sp. B1 (Mahaffey <i>et al.</i>, 1988)	
Acide 1-hydroxy-2-anthraoïque 1	Acide 3-hydroxy-2-phénanthroïque 3
Acide 2-hydroxy-3-phénanthroïque 2	
<i>Beijerinckia</i> sp. B8/36 mutant (Jerina <i>et al.</i>, 1984)	
BaA-cis-1,2-dihydrodiol 4	BaA-cis-10,11-dihydrodiol 6
BaA-cis-8,9-dihydrodiol 5	
<i>Mycobacterium</i> sp. RJGII-135 (Schneider <i>et al.</i>, 1996)	
BaA-cis-5,6-dihydrodiol 7	
BaA-cis-10,11-dihydrodiol 6	
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1 (Moody <i>et al.</i>, 2005)	
3-hydrobenzo(f)isobenzofuran-1-one 8	Acide 1-benzoyl-2-naphthoïque 16
6-hydrofuran(3,4-g)chromène-2,8-dione 9	Acide 3-(2-carboxylphényl)-2-naphthoïque 17
Benzo(g)chromène-2-one 10	5,6-diméthoxyBaA 18
Naphtho(2,1-g)chromène-10-one 11	BaA-cis-5,6-dihydrodiol 7
10-hydroxy-11-méthoxyBaA 12	5,6-dihydroxyBaA 19
10,11-diméthoxyBaA 13	BaA-cis-10,11-dihydrodiol 6
BaA-7,12-dione 14	1,2-dihydroxyanthracène 20
Acide 1-(2-hydroxybenzoyl)-2-naphthoïque 15	
<i>Sphingomonas</i> sp. KK22 (Kunihiro <i>et al.</i>, 2013)	
Acide 3-(2-hydroxyphényl)propanoïque 21	
Acide salicylique 22	
Acide 2-hydroxy-3-(2-hydroxyphényl)propanoïque 23	
Acide 3-(2-carboxyvinyl)naphthalène-2-carboxylique 24	
Acide 1,6-dihydroxynaphthalène-2,7-dicarboxylique 25	
Acide 1-(2-)[3-Hydroxy-3-oxo-prop-1-enyl]anthracène-2-(1-)-carboxylique et/ou acide 2-(3-)[3-hydroxy-3-oxo-prop-1-enyl]phénanthrène-3-(2-)-carboxylique 26	
Acide 2-hydroxy-3-naphthoïque 27	
Acide 1-hydroxy-2-naphthoïque 28	
Acide 1-hydroxy-2-anthraoïque et acide 2-hydroxy-1-anthraoïque 1 et 29	
Acide 2-hydroxy-3-phénanthroïque et acide 3-hydroxy-2-phénanthroïque 2 et 3	
Dioxygénase PhnA1A2f de <i>Sphingomonas</i> sp. LH128 (Schuler <i>et al.</i>, 2009)	
BaA-cis-1,2-dihydrodiol 4	
BaA-cis-10,11-dihydrodiol 6	

Dioxygénase Phnl de <i>Sphingomonas</i> sp. CHY-1 (Demanèche <i>et al.</i>, 2004; Jouanneau <i>et al.</i>, 2006)	
BaA-1,2-dihydrodiol 4	BaA-8,9-dihydrodiol 5
BaA-10,11-dihydrodiol 6	BaA-1,2,10,11-bis-cis-dihydrodiol 30
<i>Fusarium solani</i> MAS2 et MBS1 (Wu <i>et al.</i>, 2010)	
Acide 1,2-benzènedicarboxylique 1	
BaA-7,12-dione 2	
<i>Irpex lacteus</i> (Cajthaml <i>et al.</i>, 2006)	
BaA-7,12-dione 2	Diméthylester de l'acide phtalique 7
1-tétralone 3	Acide 2-hydroxyméthyl benzoïque 8
1,2,3,4-tétrahydro-1-hydroxynaphthalène 4	Naphthalène-1,4-dione 9
4-hydroxy-tétralone 5	1,4-dihydroxynaphthalène 10
Acide phtalique 1	Anhydride 1,2-naphthalique 11
Monométhylester de l'acide phtalique 6	
<i>Cunninghamella elegans</i> (Cerniglia <i>et al.</i>, 1994)	
BaA-trans-3,4-dihydrodiol 1	BaA-trans-10,11-dihydrodiol 3
BaA-trans-8,9-dihydrodiol 2	BaA-8,9,10,11-tétraol 4

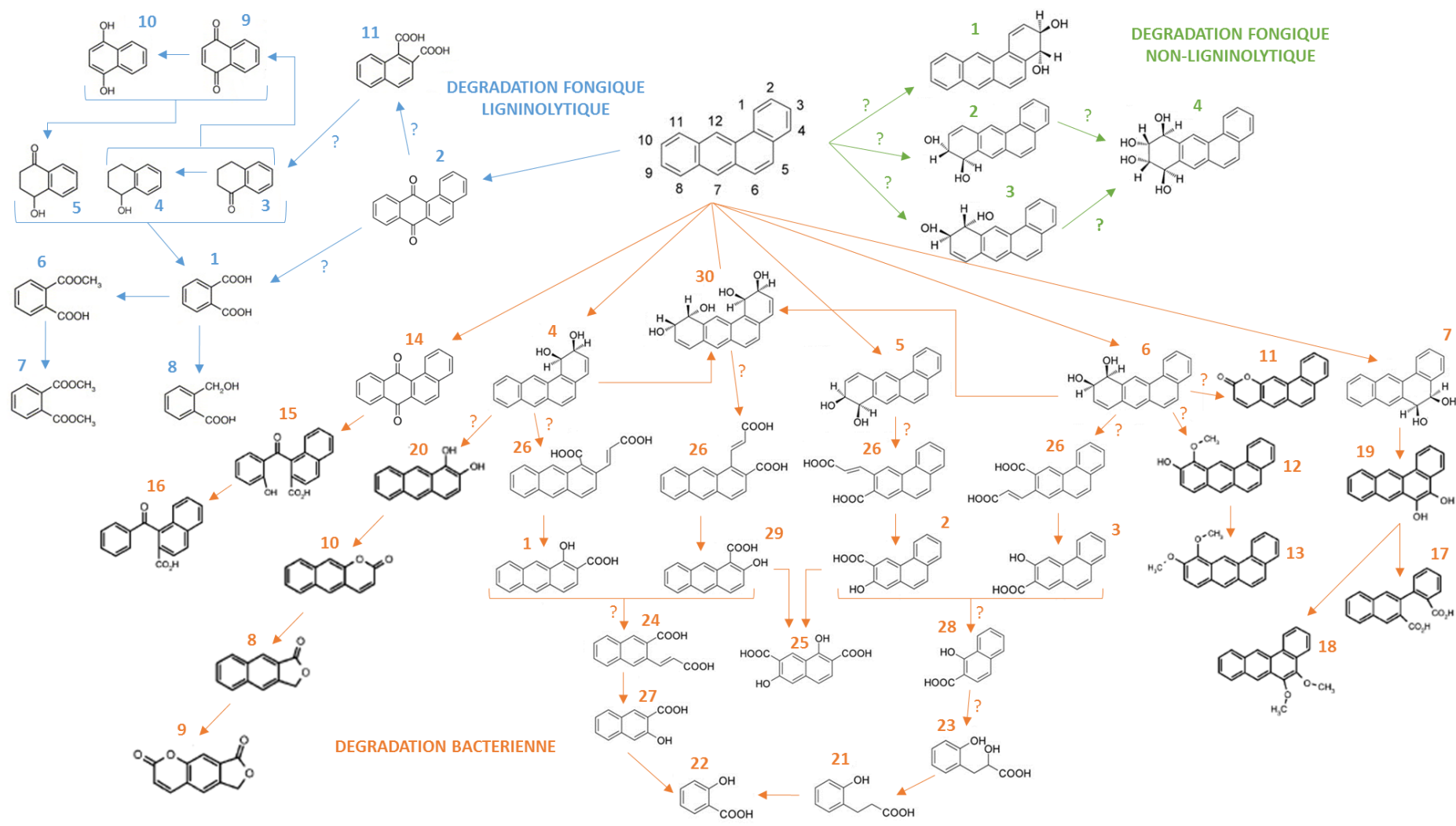


Figure 24. Voies de dégradation du benzo(a)anthracène proposées à partir des métabolites identifiés du tableau 14. Les chiffres correspondent aux noms des métabolites du tableau 8 et les points d'interrogation aux métabolites intermédiaires non identifiés.

1.4. Les méthodes de dépollution des sols

1.4.1. Généralités

Il existe de nombreuses techniques de dépollution pour tous les types de contamination (organique, inorganique), mais ce chapitre va concerner uniquement les méthodes employées pour les sols contaminés par des polluants organiques comme les HAP.

Celles-ci peuvent être appliquées « hors site » (*ex situ*) ce qui implique l'excavation du sol vers un centre de traitement ou « sur site » en traitant le sol excavé directement sur le site même (on site) ou en le laissant sur place sans excavation (*in situ*). Parmi ces techniques, il existe différents traitements (physiques, chimiques et biologiques) qui sont présentés dans le tableau 15 et qui peuvent être définis de manière générale comme suit, selon Colombano et ses collaborateurs (2010) :

- les traitements physiques consistent à utiliser des fluides (eau ou gaz) ou la chaleur (procédé thermique) pour traiter la pollution. Les fluides, présents dans le sol ou injectés, sont utilisés comme vecteur pour transporter la pollution vers des points d'extraction afin de la traiter par des procédés chimiques ou biologiques (évacuation de la pollution), ou pour l'immobiliser (piégeage de la pollution). La chaleur quant à elle est utilisée afin de volatiliser le polluant, le détruire, l'isoler ou le rendre inerte ;
- les traitements chimiques consistent à utiliser selon les propriétés chimiques des polluants des réactions appropriées afin de les inerte (ex : sorption), les détruire (ex : oxydation) ou les séparer du milieu pollué (ex : surfactant) ;
- les traitements biologiques consistent à stimuler la dégradation microbienne totale ou partielle des polluants en utilisant, entre autres, des microorganismes ou des plantes. Certains procédés permettent aussi de fixer (sorption), de solubiliser (désorption) ou d'extraire les polluants.

Tableau 15. Techniques de dépollution des sols (Colombano et al., 2010; Colombano and Mouvet, 2012; de Boer and Wagelmans, 2016; Khan et al., 2004). Les cases vertes représentent les techniques pouvant être appliquées aux HAP et les rouges les méthodes inappropriées ; 1 : technique de dépollution ex situ ou on site ; 2 : technique de dépollution in situ.

		Technique	Principe	1	2
Physique	Evacuation de la pollution	Ventilation	Extraction des polluants de la phase gazeuse de la zone non saturée par mise en dépression. Les vapeurs sont ensuite récupérées et traitées en surface.		×
		Barbotage	Même principe que la ventilation mais dans la zone saturée et la frange capillaire.		×
		Extraction double phase	Extraction des polluants des phases gazeuse et liquide de la zone non saturée par mise en dépression importante au niveau de la frange capillaire et de la partie supérieure de la zone saturée. Les liquides et les gaz récupérés sont ensuite séparés et traités.		×
		Pompage et traitement	Extraction des polluants en phase dissoute dans la zone saturée et de la frange capillaire puis traitement on site.		×
		Pompage-écrémage	Pompage des eaux souterraines polluées en présence d'un surnageant ce qui génère un cône de rabattement. Le surnageant s'accumule gravitairement au centre de ce cône et est récupéré puis traité.		×
	Piégeage de la pollution	Encapsulation	Enfermement physique sur site du sol par un dispositif de parois, couverture et fonds très peu perméables. Hors site, les terres polluées sont transférées dans des centres de stockage des déchets.	×	
		Confinement physique	Isolation du sol par des barrières physiques (isolation de surface, confinement vertical) afin d'empêcher la propagation des contaminants.		×
		Confinement hydraulique	Maintien et/ou réduction du panache de pollution en favorisant l'écoulement des eaux souterraines en un point prédéfini en vue d'un traitement afin de ne pas générer de pollution en aval.		×
	Procédé thermique	Incinération	Combustion du sol dans un four à des températures très élevées (870 à 1 200°C) conduisant à la destruction et/ou à la volatilisation des polluants. Les composés gazeux et particulaires sont ensuite récupérés en vue d'un traitement.	×	
		Désorption thermique	Chauffage du sol à des températures inférieures à celles de l'incinération (90 à 560°C) pour extraire par volatilisation les polluants. Les composés gazeux sont ensuite récupérés en vue d'un traitement.	×	×
		Vitrification	Élévation de la température du sol afin de le transformer en un matériau fondu qui se vitrifie en se refroidissant. Les composés organiques sont détruits et/ou vaporisés avant d'être traités.	×	×
		Pyrolyse	Chauffage du sol (150 à 540°C) en absence d'oxygène pour en extraire les polluants. Les gaz sont ensuite récupérés et traités.	×	
Chimique		Oxydation chimique	Apport d'un oxydant dans le sol (péroxyde d'hydrogène, persulfate, ozone, permanganate de potassium) afin de détruire totalement ou partiellement le polluant. Des agents chimiques comme des surfactants peuvent être ajoutés afin d'améliorer la désorption des contaminants.	×	×
		Mise en solution par extraction chimique	Extraction des contaminants adsorbés sur le sol par des agents chimiques adaptés (solvant, surfactant,...). Après avoir homogénéisé le sol et la solution extractante, cette dernière est récupérée puis les polluants sont séparés et traités.	×	

	Technique (suite)	Principe (suite)	1	2
Biologique	Bioaugmentation	Apport dans le sol de microorganismes possédant des capacités catalytiques de dégradation afin d'améliorer la dégradation microbienne des polluants.	×	×
	Biostimulation	Ajout dans le sol de nutriments, d'accepteurs d'électrons ou de donneur d'électrons afin d'augmenter la dégradation microbienne des polluants.	×	×
	Landfarming	Étalement sur une faible épaisseur (30 cm) du sol pollué sur un support imperméable et favorisation de la biodégradation aérobie <i>via</i> des techniques agricoles classiques (labour, ajout d'engrais,...).	×	
	Biopile (biotertre)	Mise en tas du sol pollué (hauteur < 3m) sur un support imperméable en vue d'un traitement biologique. Le sol est généralement amendé et les conditions de bioterte contrôlées (aération, ajout de nutriments,...). C'est pourquoi il est également couvert afin de contrôler la température et l'humidité. La dégradation biologique est la plupart du temps réalisée par biostimulation.	×	
	Bioréacteur	Mélange de sol pollué avec de l'eau et parfois des additifs (tensioactifs, nutriments,...) afin de mettre en suspension les particules de sol et de former un mélange boueux. Des microorganismes possédant les capacités catalytiques de dégradation du polluant sont également ajoutés. Les boues sont alors traitées par voie biologique dans des bioréacteurs puis sont déshydratées.	×	
	Compostage	Mélange du sol excavé avec des amendements organiques (compost) et disposition en tas trapézoïdaux (andains, hauteur < 3m) régulièrement espacés afin de favoriser la biodégradation. Le compost agit sur la biostimulation, la bioaugmentation et l'aération.	×	
	Phytoremédiation	Utilisation de plantes pour dégrader, transformer, volatiliser ou immobiliser les polluants.		×
	Atténuation naturelle	Diminution de la mobilité, de la toxicité ou de la concentration des contaminants dans le sol par des processus naturels (dégradation, volatilisation, adsorption,...) sans intervention humaine.		×
Chimique/ biologique	Ajouts d'agents spécifiques	Désorption des polluants par ajouts d'agents chimiques adaptés (surfactant, cyclodextrine,...) afin d'améliorer la biodisponibilité des polluants pour qu'ils puissent être dégradés par les microorganismes.	×	×
Physique/ chimique	Lavage à l'eau	Les contaminants adsorbés (sur les particules fines, préalablement séparées des particules grossières en traitement <i>ex situ</i>), sont transférés vers une phase aqueuse qui sera par la suite traitée. Afin d'augmenter ce transfert l'ajout d'agents chélatants, de surfactant ou un ajustement de pH peuvent être effectués.	×	×
	Stabilisation/solidification	Piégeage des polluants par ajout d'adjuvants afin de réduire leur mobilité. La solidification consiste à lier physiquement ou à emprisonner les polluants au sein d'une masse stable, dure et inerte. La stabilisation consiste à transformer chimiquement un polluant lessivable en un composé peu ou non soluble et/ou à augmenter les capacités de sorption du polluant avec les matériaux par mélange avec différents adjuvants afin de les rendre moins mobilisables.	×	×

Le choix du traitement à utiliser est très important pour garantir le succès de la remédiation mais il s'avère également difficile car de nombreux paramètres sont à prendre en compte (Khan *et al.*, 2004) et ce dès lors de la décision entre une méthode *in situ* ou *ex situ/on site* (Tableau 16). Les techniques *in situ* vont surtout être utilisées pour des sites encore en activité ou lorsque la zone polluée est trop étendue pour avoir recours à l'excavation (Cadière, 2012). Le choix du traitement à mettre en œuvre est ensuite fonction de différents facteurs comme le type de polluant, l'ancienneté de la contamination, le type de sol, les usages auxquels le site est destiné, le coût de la dépollution ou encore la perception des habitats. Certains procédés peuvent même être couplés pour réduire suffisamment les teneurs en polluants (Huang *et al.*, 2004; Kronholm *et al.*, 2002).

Tableau 16. Applicabilité du traitement *in situ* et *ex situ/on site* (Hyman and Dupont, 2001).

Technologie	Caractéristiques du site	Applicabilité de la technologie
Ex situ / on site	Etendue de la pollution	Etendue verticale et horizontale limitée (hot spot)
	Caractéristiques des sols	Très hétérogène, écoulements préférentiels
	Structures de surface	Pas d'encombrement du site
	Proximité des récepteurs	Pas de récepteurs sensibles à proximité immédiate (problème lors de l'excavation des sols)
	Contraintes de dépollution	Nécessité de dépolluer rapidement
In situ	Etendue de la pollution	Etendue verticale et horizontale importante
	Caractéristiques des sols	Uniforme, perméable à modérément perméable
	Structures de surface	Présence de structures sur la zone de pollution
	Proximité des récepteurs	Récepteurs sensibles à proximité immédiate
	Contraintes de dépollution	Dépollution rapide non nécessaire

En France, en 2012, plus de 5 500 000 tonnes de terres polluées ont été traitées dont environ 52 % par des méthodes *in situ* (Cadière, 2012). Ceci s'explique par l'importance des traitements de ventilation et de bioaugmentation/biostimulation qui représentent à eux seuls plus de 44 % des tonnages traités (Cadière, 2012 ; Figure 25). Les procédés physico-chimiques ont largement été utilisés (59 %), suivi par les procédés biologiques (25 %) et enfin les procédés thermiques (16 %) (Cadière, 2012).

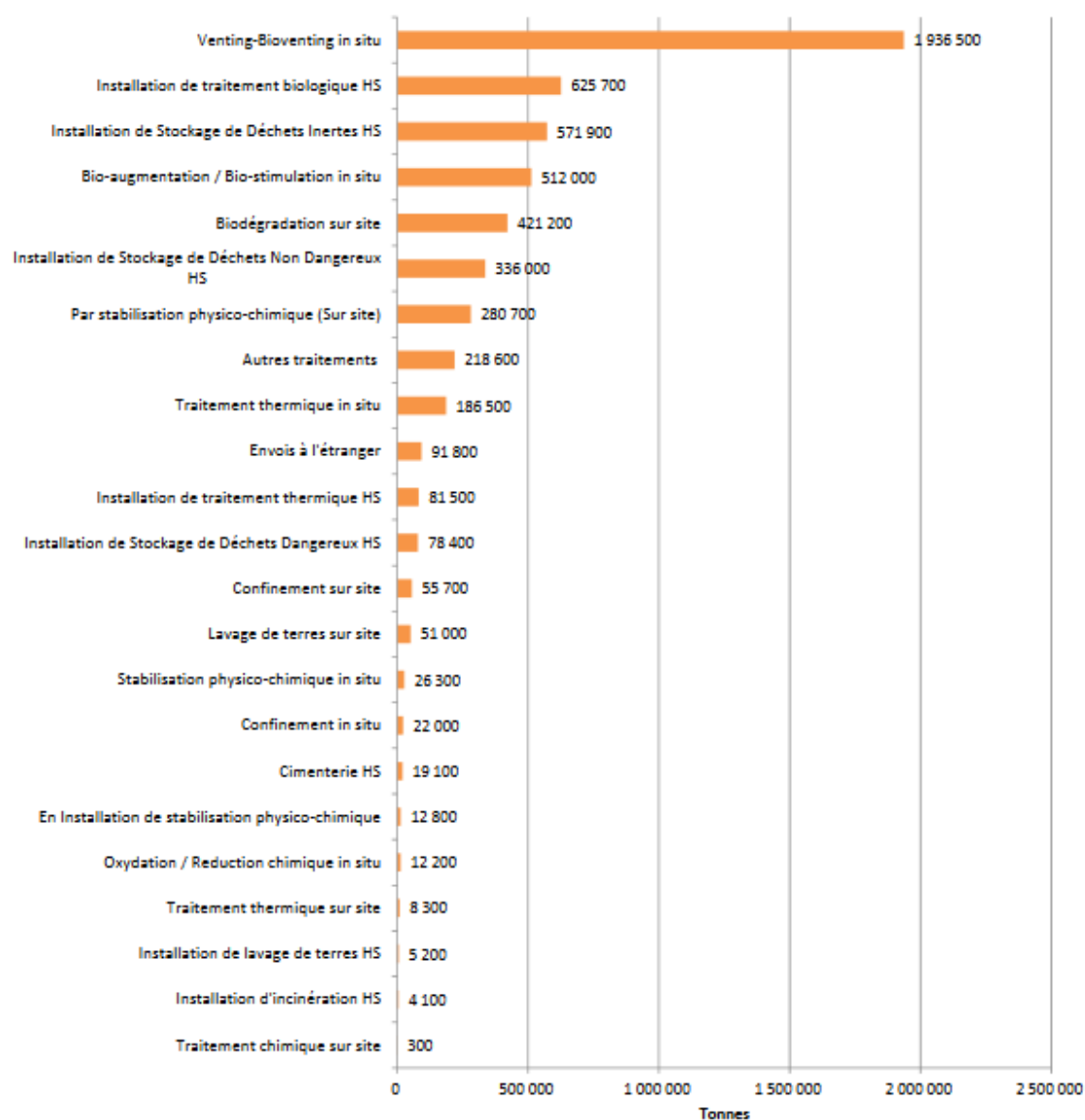


Figure 25. Quantité de sols pollués traités en tonnes par différentes techniques de dépollution en France en 2012 (Cadière, 2012). HS : hors site.

Sur les plus de 5 500 000 tonnes de terres traitées, 5 % étaient polluées par les HAP (Cadière, 2012). Les cases vertes du tableau 15 représentent les méthodes de dépollution qui peuvent être appliquées aux HAP et les rouges les méthodes inappropriées. Ces dernières représentent principalement des procédés qui sont utilisés pour des composés (semi)-volatils (ventilation, extraction double phase,...) ce qui n'est pas le cas des HAP en général. En ce qui concerne l'atténuation naturelle contrôlée, elle est limitée pour les HAP à cause de leur hydrophobicité et du processus de vieillissement de la contamination (Colombano and Mouvet, 2012). Seules les molécules de faible poids moléculaire peuvent être éliminées par ces procédés. Les sols pollués par de fortes concentrations en HAP sont principalement

traités par des techniques thermiques avec l'incinération pour des teneurs totales supérieures à 40 000 – 45 000 mg.kg⁻¹ et avec la désorption thermique pour des teneurs de l'ordre de 15 000 à 40 000 mg.kg⁻¹ (Colombano and Mouvet, 2012). Bien que ces techniques soient très efficaces et rapides (Cadière, 2012), elles modifient les propriétés physico-chimiques et biologiques des sols (Cébron *et al.*, 2009, 2011), aboutissant à une matrice dépolluée plutôt qu'à un sol. De plus, elles sont très coûteuses (Cadière, 2012) puisque les prix varient de 190 à 1 050 €/t de sols traités après excavation pour l'incinération et de 60 à 110 €/t pour la désorption thermique (Colombano *et al.*, 2010). De manière générale, les techniques physiques et chimiques sont coûteuses et lourdes à mettre en œuvre alors que les techniques biologiques sont plus respectueuses de l'environnement puisqu'elles stimulent un phénomène naturel et sont moins onéreuses (Cadière, 2012) avec des coûts 50 à 80 % plus faibles (Raskin and Ensley, 2000). Bien qu'elles aient souvent des durées de réhabilitation plus longues que les autres procédés (Colombano *et al.*, 2010), les techniques biologiques sont considérées comme les plus appropriées pour remédier des sols pollués aux HAP (Kalantary *et al.*, 2014). Parmi ces techniques, la biostimulation, la bioaugmentation et la phytoremédiation ont été utilisées lors de ces travaux de thèse.

1.4.2. Biostimulation

La biostimulation consiste à stimuler l'activité et la croissance des microorganismes indigènes du sol par l'ajout de certains composés afin d'améliorer la biodégradation des polluants. Parmi ces composés, des nutriments, des accepteurs d'électrons ou des donneurs d'électrons peuvent être apportés.

1.4.2.1. Nutriments

Les nutriments peuvent comprendre des macronutriments (azote, carbone, phosphore,...), des micronutriments (magnésium, calcium, soufre,...) ainsi que des éléments traces (cobalt, nickel, molybdène,...). Le besoin en nutriments des microorganismes est quasiment similaire à leur composition cellulaire (Liebeg and Cutright, 1999 ; Tableau 17).

Tableau 17. Composition chimique typique d'une cellule bactérienne (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

Élément	Pourcentage du poids sec de la cellule
Carbone	50
Oxygène	22
Azote	12
Hydrogène	9
Phosphore	2
Soufre	1
Potassium	1
Sodium	1
Calcium	0,5
Magnésium	0,5
Chlore	0,5
Fer	0,2
Autres éléments traces	0,3

Bien que l'apport en carbone soit le plus important, celui-ci peut être fourni par les polluants (Kalantary *et al.*, 2014; Liebeg and Cutright, 1999). Si les composés sont facilement et rapidement minéralisés (HAP de faible poids moléculaire), l'addition d'une source de carbone supplémentaire sera requise pour subvenir aux besoins des microorganismes alors que si la minéralisation des composés est plus longue (HAP de haut poids moléculaire), l'ajout de carbone ne sera pas indispensable jusqu'à la minéralisation complète du polluant (Liegbe and Cutright, 1999). En ce qui concerne les micronutriments et les éléments traces, leurs besoins sont très différents selon les microorganismes (Kalantary *et al.*, 2014), certains étant même non nécessaires du fait de leurs faibles quantités (Liegbe and Cutright, 1999). L'étude de Liebeg et Cutright, (1999), souligne l'importance de l'ajout de phosphore pour garantir le succès de la remédiation d'un sol pollué aux HAP. En revanche, l'étude de Kalantary et ses collaborateurs (2014) montre une biodégradation optimale du phénanthrène en utilisant l'azote comme macronutriment principal. Il existe donc de nombreux protocoles avec différentes compositions de nutriments (Andreolli *et al.*, 2015; Ghaly *et al.*, 2013; Kalantary *et al.*, 2014; Leys *et al.*, 2005; Liebeg and Cutright, 1999) car il n'y a pas de méthodes spécifiques pour déterminer les types et les quantités exactes d'éléments nutritifs à utiliser ainsi que les impacts qu'ils vont engendrer. Tout ceci dépend de plusieurs paramètres comme le type et la composition du sol, la quantité et la

biodisponibilité des nutriments déjà présents, la microflore ou encore le type, la biodisponibilité et la teneur en polluant. C'est pourquoi la biostimulation peut s'avérer inefficace comme le montre l'étude de Yu et ses collaborateurs (2005) où seule la dégradation du pyrène a été améliorée tandis que celles du phénanthrène et du fluorène ont été inhibées alors que ces trois HAP étaient présents simultanément. Les auteurs ont expliqué ce phénomène par une stimulation sélective des microorganismes capables de dégrader le pyrène. Un autre exemple concerne l'étude de Johnson et Scow (1999) où du phosphore et de l'azote ont été apportés sur quatre types de sols différents pollués au phénanthrène. La biostimulation a conduit à un taux de dégradation du HAP inchangé ou inhibé. Une des causes de ce résultat serait la faible biodisponibilité des nutriments apportés. En effet, certains éléments nutritifs comme le phosphore peuvent adhérer au sol (Antoniadis *et al.*, 2016; Singh and Gilkes, 1991; van der Salm *et al.*, 2016), devenant alors inaccessibles pour les microorganismes.

1.4.2.2. Accepteurs d'électrons

Les accepteurs d'électrons correspondent par exemple à des nitrates ou des sulfates (Coates *et al.*, 1996; Mihelcic and Luthy, 1988) pour les microorganismes anaérobies. En effet, l'étude de Weiner et ses collaborateurs (1998) a montré une augmentation de la biodégradation du benzène suite à l'ajout de sulfate dans un sédiment pollué. Bien que ces composés aient l'avantage d'être solubles dans l'eau et donc biodisponibles pour les microorganismes, leur utilisation est limitée car ils vont pouvoir diffuser loin de la zone d'application et contaminer les milieux environnants (Brito *et al.*, 1999; Menció *et al.*, 2016). Le problème majeur représente la contamination des eaux souterraines puisque cela va impacter directement la santé humaine *via* l'eau potable (Ward *et al.*, 2005). La norme européenne a par exemple fixé la limite de concentration en nitrate dans l'eau à 50 mg.L⁻¹ (Directive 98/83/CE, 1998). Une teneur trop élevée pourrait conduire chez l'Homme à l'apparition de méthémoglobinémie²² (Kumar and Puri, 2012). De l'oxygène peut également être ajouté dans le sol pour les microorganismes aérobies par bioventing et/ou biosparging. Le bioventing permet de traiter la zone non saturée du sol alors que le biosparging est utilisé pour traiter la zone saturée et la zone capillaire (Colombano *et al.*, 2010). Tang et ses

²² Diminution de la capacité des globules rouges à transporter l'oxygène.

collaborateurs (2005) soulignent le fait que le succès de la biodégradation, du à l'ajout d'accepteurs d'électrons comme le nitrate et le phosphate dans leur étude, n'était possible que grâce aux teneurs insuffisantes en éléments nutritifs inhérents aux sites.

1.4.2.3. Donneurs d'électrons

Les donneurs d'électrons concernent l'hydrogène (Colombano *et al.*, 2010) pour les microorganismes anaérobies et des composés organiques tels que le glucose, le lactate ou l'acétate pour les microorganismes aérobies. En effet, l'étude de Yuan et ses collaborateurs (2000) a montré que l'ajout de glucose ou d'extrait de levure augmentait la dégradation du phénanthrène en milieu liquide. Etant des contaminants organiques, les HAP fournissent alors également des électrons que la microflore peut extraire afin d'obtenir de l'énergie (Li, 2010).

1.4.3. Bioaugmentation

Lorsque l'atténuation naturelle et la biostimulation se sont avérées inefficaces, Iwamoto et Nasu (2001) considèrent que la bioaugmentation doit être appliquée. En effet, la biostimulation correspond à une gestion « à l'aveugle » de la microflore puisque les microorganismes qui bénéficient de cette stimulation ne sont pas forcément ceux impliqués dans la dégradation du contaminant

La bioaugmentation consiste à améliorer la dégradation du polluant par l'ajout de microorganismes spécifiques possédant les capacités catalytiques de dégradation du contaminant (Hamdi *et al.*, 2007; Iwamoto and Nasu, 2001; Mancera-López *et al.*, 2008). Cette méthode est donc utilisée lorsque la microflore indigène du sol n'est pas optimale dans la métabolisation du composé (Silva *et al.*, 2009b). Selon Forsyth et ses collaborateurs (1995), la bioaugmentation doit être appliquée aux sols qui possèdent un nombre faible ou non détectable de microorganismes dégradants, des polluants qui requièrent plusieurs processus de remédiation dont certains nuisibles ou toxiques pour les microorganismes, et qui ont une surface de pollution peu étendue sur laquelle les coûts des méthodes non-biologiques sont supérieurs à ceux de la bioaugmentation.

Les souches qui sont inoculées doivent être capables de résister à différentes conditions environnementales du sol et survivre à la présence d'autres microorganismes (Jacques *et al.*, 2008; Mancera-López *et al.*, 2008). En effet, de nombreux paramètres abiotiques et biotiques peuvent influencer l'efficacité de la bioaugmentation (Bento *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2000; Veen *et al.*, 1997; Wolski *et al.*, 2005) pouvant conduire à une diminution du taux de dégradation (Cho *et al.*, 2000; Wolski *et al.*, 2005) ou du nombre de cellules exogènes peu de temps après l'inoculation (England *et al.*, 1993; Johannes Sørensen *et al.*, 1999). Pour plusieurs études, la bioaugmentation s'est donc avérée inefficace (Karamalidis *et al.*, 2010; Launen *et al.*, 2002; Saponaro *et al.*, 2002; Sayara *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2009b). Par exemple, le potentiel hydrique du sol a eu une influence significative sur la survie et l'activité dégradante de *Pseudomonas stutzeri* P16 *luxAB4* dans un sol pollué par du phénanthrène qu'il soit stérile ou non (Mashreghi, 2006). Les facteurs biotiques concernent la compétition entre les microorganismes indigènes et exogènes pour les sources de carbone, ainsi que les interactions antagonistes et la prédation par les protozoaires et les bactériophages. Ainsi, il a été démontré que la croissance et l'activité enzymatique de *Dichomitus squalens*, un champignon de la pourriture blanche, ont été influencées négativement par la présence des microorganismes indigènes lorsqu'il a été inoculé dans un nouvel environnement (Lang *et al.*, 1998). La diversité des espèces natives doit agir comme une barrière résistante à l'invasion d'espèces non natives (Kennedy *et al.*, 2002). Un autre paramètre important à prendre en compte est la biodisponibilité du polluant notamment pour les composés hydrophobes comme les HAP puisque la dégradation du polluant par les souches inoculées sera corrélée à sa biodisponibilité (Covino *et al.*, 2010). Dans ce cas, il est intéressant d'utiliser des souches capables de produire des surfactants pour les rendre plus bioaccessibles (Sun *et al.*, 2012). Afin d'améliorer la survie, la persistance et l'activité dégradante des microorganismes, ceux-ci peuvent être préalablement adaptés à l'environnement ciblé (Megharaj *et al.*, 1997). De plus, une pré-exposition suivie par une ré-exposition à un polluant chimique augmentera le potentiel métabolique des microorganismes (Reddy and Sethunathan, 1983), un phénomène référé à la « mémoire des sols » (Megharaj *et al.*, 2011).

Les souches utilisées peuvent être allochtones ou indigènes. Ces dernières présentent l'avantage d'être plus adaptées au milieu que les inocula allochtones et moins compétitives

vis-à-vis des autres microorganismes indigènes (Hosokawa *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009b; Ueno *et al.*, 2007). Beaucoup d'études ont utilisé des bactéries à Gram négatif appartenant au genre *Pseudomonas* (Heinaru *et al.*, 2005), *Flavobacterium* (Crawford and Mohn, 1985), *Sphingobium* (Dams *et al.*, 2007), *Alcaligenes* (Haluška *et al.*, 1995) et *Achromobacter* (Ronen *et al.*, 2000). Cependant les bactéries à Gram positif s'avèrent également efficaces avec les genres *Rhodococcus* (Briglia *et al.*, 1990), *Mycobacterium* (Jacques *et al.*, 2008) et *Bacillus* (Silva *et al.*, 2009b). En ce qui concerne les champignons, il s'agit des espèces appartenant aux genres *Absidia* (Garon *et al.*, 2004), *Achremonium* (Silva *et al.*, 2009b), *Aspergillus* (Santos *et al.*, 2008), *Verticillium* (Silva *et al.*, 2009b), *Penicillium* (Mancera-López *et al.*, 2008) et *Mucor* (Szewczyk and Długoński, 2009). Un des avantages des champignons est leur rapidité d'incorporation dans la matrice du sol (Sayara *et al.*, 2011). De plus, ils ont la capacité de croître dans des environnements avec une faible concentration en nutriments, une faible humidité et des conditions acides (Mollea *et al.*, 2005). Des exemples d'espèces microbiennes utilisées en bioaugmentation sur des sols contaminés par des HAP sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12. Espèces microbiennes utilisées en bioaugmentation sur des sols pollués par des HAP.

	Microorganisme	Contaminant	Référence
Bactérie	<i>Paracoccus</i> sp. HPD-2	16 HAP prioritaires selon l'US-EPA	Teng <i>et al.</i> , 2010
	<i>Sphingobium</i> sp.	Phénanthrène	Festa <i>et al.</i> , 2016
	Consortium : <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp. et <i>Pseudomonas</i> sp.	Mélange de HAP : fluorène, phénanthrène et pyrène	Yu <i>et al.</i> , 2005
	Consortium : <i>Bacillus</i> souches B1F, B5A et B3G, <i>Chromobacterium</i> sp. 4015 et <i>Enterobacter agglomerans</i> sp. B1A	Mélange de HAP : anthracène, benzo(a)pyrène, dibenzo(a)anthracène naphthalène, phénanthrène, et pyrène	Silva <i>et al.</i> , 2009b
Champignon	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Trichocladium canadense</i>	Naphtalène Phénanthrène	Silva <i>et al.</i> , 2009a
	<i>Absidia cylindrospora</i>	Fluorène	Garon <i>et al.</i> , 2004
	<i>Achremonium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Trichocladium canadense</i> <i>Verticillium</i> sp.	Chrysène, Décacyclène Naphthol-2,3a-pyrène Pérylène	Silva <i>et al.</i> , 2009a

	Microorganisme (suite)	Contaminant (suite)	Référence (suite)
Champignon	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Mélange de HAP : acénaphthène, fluorène, phénanthrène, fluoranthène, pyrène, chrysène, benzo(a)pyrène, dibenz(ah)anthracène, et benzo(ghi)pérylène	Zheng and Obbard, 2002
	Consortium : <i>Achremonium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. et <i>Verticillium</i> sp.	Mélange de HAP : anthracène, benzo(a)pyrène, dibenzo(a)anthracène naphthalène, phénanthrène, et pyrène	Silva <i>et al.</i> , 2009b
Bactérie et champignon	Consortium : <i>Mycobacterium</i> <i>fortuitum</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Microbacterium</i> sp., <i>Gordonia</i> <i>polyisoprenivorans</i> , <i>Microbacteriaceae bacterium</i> et <i>Fusarium oxysporum</i>	Anthracène Phénanthrène Pyrène	Jacques <i>et al.</i> , 2008

Lors de l'inoculation, des souches pures peuvent être utilisées seules ou en consortia. Selon plusieurs études, l'utilisation de consortia bactériens s'est avérée plus efficace que les souches pures (Mrozik and Piotrowska-Seget, 2010). En effet, les composés intermédiaires de la voie catabolique d'une seule souche peuvent ensuite être dégradés par les autres souches possédant les voies cataboliques appropriées (Heinaru *et al.*, 2005). Des consortia composés de bactéries et de champignons peuvent également être utilisés car les champignons vont pouvoir réaliser le clivage initial de la molécule et les bactéries dégrader les métabolites résultants (Sayara *et al.*, 2011). L'étude de Jacques et ses collaborateurs (2008) a montré une dégradation plus efficace de l'anthracène lorsque le consortium bactérie et champignon a été utilisé plutôt que les souches seules. De plus, selon cette étude, les champignons permettraient d'augmenter la biodisponibilité du polluant envers les bactéries grâce à leurs hyphes. En effet, la formation d'un film d'eau autour des groupes d'hyphes agirait comme un vecteur de dispersion, permettant aux bactéries de se déplacer vers le contaminant.

Afin d'accélérer la dégradation des polluants, l'inoculation de cellules immobilisées peut être effectuée. Celles-ci sont immobilisées par fixation sur un support inerte, par inclusion dans un polymère ou par confinement grâce à une barrière physique (Bayat *et al.*, 2015), ce qui

permet de protéger les microorganismes inoculés des conditions environnementales sub-optimales (présence de substances toxiques, pH non optimal) et de réduire la compétition avec la microflore indigène (Lin *et al.*, 1991; Pritchard, 1992). De plus, l'immobilisation augmente la stabilité biologique des cellules, dont les plasmides (Cassidy *et al.*, 1996) qui contiennent en général les gènes de dégradation. Une autre méthode consiste à utiliser des microorganismes génétiquement modifiés. C'est le cas de *Pseudomonas putida* KT2442 qui a été utilisé pour la dégradation du naphtalène avec un transfert du plasmide catabolique aux microorganismes indigènes (Filonov *et al.*, 2005). Mais il y a des inconvénients à l'utilisation de souches génétiquement modifiées comme une diminution de la valeur sélective (fitness) et une demande en besoins énergétiques supplémentaires imposée par la présence du matériel génétique étranger dans les cellules (Sayler and Ripp, 2000; Singh *et al.*, 2011). De plus, les éléments génétiques mobiles (plasmides), peuvent être acquis par des organismes indésirables (Megharaj *et al.*, 2011). Mais les avancées biotechnologiques telles que la mort cellulaire programmée après la dépollution peut aider à développer des « microorganismes génétiquement modifiés suicidaires » qui peuvent conduire à une bioremédiation plus sûre et efficace (Pandey *et al.*, 2005). Cependant, en France, les organismes génétiquement modifiés (OGM) ne sont pas utilisés pour des applications sur le terrain à cause des règles strictes pour la libération d'OGM dans l'environnement mais des essais sont réalisés aux Etats-Unis (Ezezika and Singer, 2010; Roudier, 2005). En effet, il y a un manque d'informations sur la dynamique des populations des microorganismes introduits, un mauvais contrôle physiologique de l'expression des gènes cataboliques dans les organismes ainsi que des risques de transfert horizontal de gènes (Boopathy, 2000; Cases and de Lorenzo, 2005; Velkov, 2001). Le seul OGM approuvé pour des tests de bioremédiation sur le terrain aux Etats-Unis est *Pseudomonas fluorescens* HK44 qui possède un plasmide catabolique du naphtalène (pUTK21) (Ripp *et al.*, 2000).

Plusieurs études ont également combiné la biostimulation et la bioaugmentation afin d'améliorer la dégradation du polluant. L'utilisation conjointe de ces deux procédés s'est avérée plus efficace que lorsqu'ils étaient utilisés seuls (Ghaly *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2012). En revanche, d'après l'étude de Hamdi et ses collaborateurs (2007), bien que cette combinaison se soit montrée efficace sur un sol pollué aux HAP, l'efficacité semblait surtout provenir de la sélectivité et de la spécialisation des microorganismes inoculés plutôt que des

nutriments ajoutés. Il en est de même avec l'étude de Mancera-López et ses collaborateurs (2008), où la dégradation du polluant a principalement été expliquée par la bioaugmentation puisqu'une corrélation positive a été observée entre l'activité respiratoire des microorganismes et la dissipation du contaminant.

1.4.4. Phytoremédiation

La phytoremédiation consiste à utiliser des plantes et des microorganismes associés afin d'extraire, séquestrer ou dégrader les polluants (de-Bashan *et al.*, 2012; Kuiper *et al.*, 2004). Lorsqu'elle est appliquée aux sols pollués par les HAP, la phytoremédiation repose sur plusieurs mécanismes, à savoir la phytodégradation, la phytoaccumulation, la phytovolatilisation, la phytostabilisation et la rhizoremédiation (Figure 26).

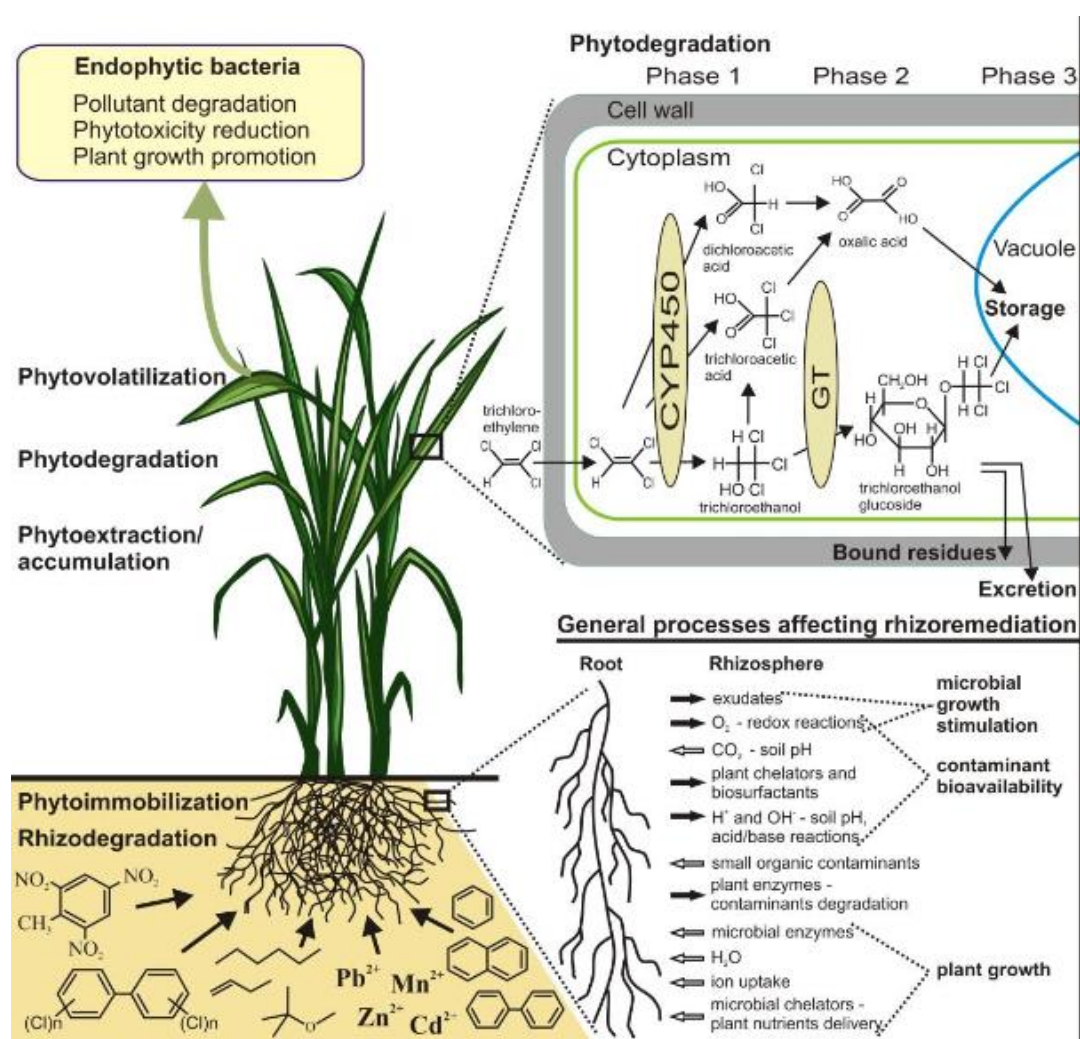


Figure 26. Les différents mécanismes de la phytoremédiation (Truu *et al.*, 2015).

1.4.4.1. La phytodégradation

Elle correspond à la dégradation du polluant par des processus et des mécanismes internes à la plante (Newman and Reynolds, 2004). Celle-ci possède des enzymes telles que le cytochrome P450 et la glutathion S-transférase pouvant servir à la dégradation des composés toxiques (Gaskin, 2008). Une fois présent dans la plante, le composé va subir une ou plusieurs phases de détoxification, à savoir, une phase I correspondant à la transformation du polluant (oxydation : cytochrome P450, réduction), une phase II consistant à des réactions de conjugaison (avec la glutathion S-transférase) et enfin, une phase III correspondant à la compartimentation des métabolites (stockage dans une vacuole ou liaison à la paroi cellulaire) ou à leur excrétion (Gaskin, 2008; Kathi and Khan, 2011). Peu d'études ont montré une dégradation des HAP directement par phytodégradation (Gaskin, 2008). Parmi elles, celle de Edwards et ses collaborateurs (1982) montre que l'anthracène a été assimilé, transloqué et dégradé par du soja. Cependant, la majorité du polluant est restée dans le sol (93 %) probablement à cause de son hydrophobicité. Les composés possédant un log Kow compris entre 0,5 et 3 sont les plus susceptibles d'être absorbés puis transportés dans la plante (Alkorta and Garbisu, 2001; Ryan *et al.*, 1988; Wenzel, 2009; Wick *et al.*, 2011). Ceux qui sont très hydrophobes avec un log Kow supérieur à 3-3,5 sont fortement liés à la matière organique du sol (Wild and Jones, 1992a) ou adsorbés sur l'épiderme des racines (Fismes *et al.*, 2002; Kipopoulou *et al.*, 1999; Wild and Jones, 1992a). L'absorption racinaire dépend alors des propriétés des HAP (Gao *et al.*, 2006; Su and Zhu, 2008), de leur concentration dans la solution du sol (Chiou *et al.*, 2001; Su and Zhu, 2008; Watts *et al.*, 2006), des propriétés du sol comme sa teneur en matière organique (Nam and Kim, 2002) et de l'espèce végétale (Fismes *et al.*, 2002; Schwab *et al.*, 1998). Les bactéries endophytes (qui colonisent les tissus internes de la plante) peuvent aussi jouer un rôle dans la dégradation des HAP, rendant la phytoremédiation plus efficace (Doty, 2008; Weyens *et al.*, 2009). Ces microorganismes entrent dans la plante principalement *via* les racines (Germaine *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 1997) puis résident dans des tissus spécifiques comme le cortex racinaire ou le xylème, mais peuvent aussi coloniser la plante *via* le système vasculaire ou l'apoplaste (Amora-Lazcano *et al.*, 2010). Les bactéries endophytes appartiennent aux genres communément retrouvés dans le sol comme *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus* et *Azospirillum* (Lodewyckx *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2006; Yrjälä *et*

al., 2010). De plus, ces bactéries ont la capacité d'améliorer la croissance de la plante et de la protéger des pathogènes car elles peuvent être antagonistes (Berg *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2008). Enfin, comme cela a été mentionné dans le paragraphe « 1.3.3.2.2. Dégradation par la rhizosphère », certaines enzymes produites par la plante peuvent directement dégrader le polluant en dehors de la plante.

1.4.4.2. La phytoaccumulation (phytoextraction)

Ce processus correspond à la séquestration du polluant dans la plante (Alkorta and Garbisu, 2001) lorsque celle-ci ne l'a pas rapidement ou complètement dégradé (Susarla *et al.*, 2002). Reilley et ses collaborateurs (1996) ont montré que l'accumulation totale de pyrène et d'anthracène dans les racines et les parties aériennes de différentes plantes était inférieure à 0,03 % du total de ce qui avait été ajouté dans le sol. L'étude de Yi et Crowley (2007) a montré que moins de 0,01 mg.kg⁻¹ de HAP étaient détectés dans les racines et les parties aériennes de 43 plantes différentes. Ceci prouve que l'absorption des HAP est très faible et insignifiante pour réduire leur teneur dans les sols ou que la phytodégradation, trop rapide, empêche une détection. Dans l'étude de Watts et ses collaborateurs (2006), les concentrations retrouvées dans les feuilles de spartine à feuilles alternes (*Spartina alterniflora*) étaient environ 3 à 4 ordres de grandeur plus faibles que celles retrouvées dans le sol. Le caractère lipophile des HAP peut expliquer le faible transport des composés dans les tissus végétaux (Fismes *et al.*, 2002; Su and Zhu, 2008; Watts *et al.*, 2006).

1.4.4.3. La phytovolatilisation

Elle correspond à l'assimilation et à la transpiration du contaminant par la plante. Le composé ou ses métabolites étant relargués dans l'atmosphère, des problèmes de conformité réglementaire avec les directives de la qualité de l'air peuvent avoir lieu (Gaskin, 2008). Un exemple de phytovolatilisation concerne l'étude de Watkins et ses collaborateurs (1994) où une augmentation de la volatilisation du naphthalène a été observée en présence de l'herbe de Rhodes. Ils suggèrent que le HAP a été prélevé par les racines, transloqué dans la plante puis volatilisé. Ce processus de phytoremédiation concerne principalement les HAP

de faible poids moléculaire (Gerhardt *et al.*, 2009) puisqu'ils sont plus volatils et moins hydrophobes.

1.4.4.4. La phytostabilisation (phytoimmobilisation)

Ce procédé consiste à contenir le polluant dans le sol en réduisant sa biodisponibilité et sa mobilité. Les contaminants peuvent être adsorbés au niveau de la surface racinaire ou bien isolés et séquestrés dans la rhizosphère. Les molécules se trouvant dissoutes dans la solution du sol et en dehors de la zone racinaire vont pouvoir être transportées vers les racines grâce au flux de transpiration de la plante (Gaskin, 2008; Mohan *et al.*, 2006). Celle-ci va fournir dans la rhizosphère de la matière organique qui va pouvoir conduire à une stabilisation des composés par adsorption ou séquestration, comme cela a déjà été mentionné dans le paragraphe « 1.3.1. Transport et séquestration ». La matière organique peut provenir notamment de la décomposition des racines, un tiers du carbone des débris végétaux restant dans le sol sous forme de composants stables et labiles de l'humus après la première période de croissance de la plante (Zhou, 2010). La plante peut aussi produire des enzymes qui vont lier les contaminants à la matière organique du sol lors du processus d'humification (Frick *et al.*, 1999). Les composés organiques possédant un log K_{OW} supérieur à 3-3,5 sont fortement sorbés aux racines (Fismes *et al.*, 2002; Kipopoulou *et al.*, 1999; Wild and Jones, 1992a). L'étude de Schwab et ses collaborateurs (1998) a montré une adsorption du naphtalène sur les racines d'alfalfa et de fétuque, avec une adsorption davantage importante en fonction de l'augmentation de l'âge de la plante. Ceci souligne l'impact de l'âge de l'espèce végétale sur l'efficacité de la phytoremédiation. En revanche, l'étude de Binet et ses collaborateurs (2000) a montré une phytostabilisation faible d'un mélange de 8 HAP avec 0,006-0,11 % d'HAP extraits à la surface des racines de raygrass.

1.4.4.5. La rhizoremédiation (rhizodégradation)

Elle implique la dégradation des polluants *via* la stimulation des microorganismes rhizosphériques (Kuiper *et al.*, 2004). La rhizoremédiation est considérée comme le mécanisme principal de dégradation des HAP en phytoremédiation (Frick *et al.*, 1999; Su and Zhu, 2008) surtout pour ceux de haut poids moléculaire (Gerhardt *et al.*, 2009). Les

différents mécanismes intervenant lors de ce procédé ont été évoqués dans le paragraphe « 1.3.3.2.2. Dégradation par la rhizosphère ». En retour à la stimulation de leur activité, les microorganismes fournissent de nombreux bénéfices à la plante tels que la synthèse de composés qui vont diminuer le niveau de ses hormones de stress, une protection vis-à-vis des pathogènes, un apport de ses éléments nutritifs essentiels en jouant le rôle de chélateurs et bien sûr, la dégradation des contaminants avant qu'ils puissent impacter négativement la plante (Gerhardt *et al.*, 2009).

Bien qu'il existe plusieurs formes de phytoremédiation, tous ces mécanismes (phytodégradation, phytoaccumulation,...) interagissent ensemble. Ils vont pouvoir agir simultanément ou certains seront plus prononcés que d'autres selon l'espèce végétale utilisée, les caractéristiques physico-chimiques du polluant et sa biodisponibilité ou encore selon les caractéristiques physico-chimiques et biologiques du sol.

1.4.4.6. Avantages et facteurs influençant la phytoremédiation

En plus de la remédiation, la phytoremédiation possède plusieurs avantages comme l'amélioration de la qualité du sol (apports en carbone organique, en nutriments...) (Cunningham *et al.*, 1996; Gerhardt *et al.*, 2009) avec notamment le maintien ou la restauration de sa microflore et de sa microfaune lui permettant une meilleure fonctionnalité (Bert, 2013) et l'amélioration de sa structure (augmentation des agrégats, de la porosité,...) (Cunningham *et al.*, 1996; Gerhardt *et al.*, 2009). Le couvert végétal limite l'érosion du sol et l'envol de poussière pouvant contenir des polluants (Bert, 2013; Frick *et al.*, 1999), limite le lessivage des composés et leur transfert vers la nappe phréatique (Bert, 2013) et améliore le site au niveau de sa biodiversité et de son esthétisme (Bert, 2013; Cunningham *et al.*, 1996). De plus, il est parfois possible de valoriser économiquement la biomasse produite en éco-matériaux, en biocarburants ou encore en compost (Bert, 2013) ce qui permet de compenser financièrement la durée importante nécessaire à la remédiation des sites puisque plusieurs saisons de culture sont généralement requises afin de décontaminer un site (Frick *et al.*, 1999).

Divers facteurs vont cependant influencer l'efficacité de la phytoremédiation :

- le polluant de part ses caractéristiques physico-chimiques, sa concentration et sa biodisponibilité dans le sol (Cunningham *et al.*, 1996). De plus, s'il s'avère phytotoxique, il peut limiter la germination, la croissance et la biomasse de la plante (Adam and Duncan, 1999; Bert, 2013; Doty, 2008), ce qui peut, en partie, expliquer le fait que la phytoremédiation peut être un processus très long ;
- la distribution hétérogène des polluants dans le sol avec des « hotspots » de contamination (Gerhardt *et al.*, 2009; Kathi and Khan, 2011) ce qui va limiter leur accès par la plante ;
- les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol (pH, teneur en eau, activité microbienne, pathogène, nutriments,...) (Frick *et al.*, 1999; Gerhardt *et al.*, 2009; Kathi and Khan, 2011; Wick *et al.*, 2011) ainsi que les facteurs climatiques comme la température et les précipitations (Kuiper *et al.*, 2004; Nedunuri *et al.*, 2000) qui vont affecter la croissance de la plante mais également la biodisponibilité du polluant ;
- la croissance « lente » de la plante (Kuiper *et al.*, 2004) qui va influencer la durée de la phytoremédiation ;
- la morphologie racinaire de l'espèce végétale (longueur, surface et quantité) (Walker *et al.*, 2003; Wick *et al.*, 2011) qui va déterminer l'accès au polluant. Aussi, seuls les composés se trouvant au niveau des racines sont impactés (Bert, 2013; Frick *et al.*, 1999) ce qui réduit la zone de dépollution ;
- la physiologie de la plante (exsudats racinaires) et les interactions microbiennes dans la rhizosphère (Walker *et al.*, 2003) ;
- la compétition avec les autres espèces végétales (Nedunuri *et al.*, 2000) pouvant affecter la croissance de la plante.

1.4.4.7. Le choix de la plante

Le choix de la plante doit se porter sur une espèce résistante au polluant, pérenne, adaptée au milieu, non appétente (s'il s'agit de phytodégradation ou de phytoaccumulation) afin de limiter le transfert des composés de la plante vers les animaux, et ayant un système racinaire dense et profond (Bert, 2013). Il est préférable d'utiliser une espèce végétale native afin de faciliter son établissement dans le milieu vis-à-vis de la compétition avec les autres espèces, du peu de nutriments potentiellement présents dans le sol, ce qui est souvent le cas des

zones polluées (Gaskin, 2008), et des conditions climatiques. Les plantes pérennes sont préférées aux plantes annuelles et bisannuelles car elles nécessitent moins d'entretien, sont plus économiques (Gan *et al.*, 2009; Kathi and Khan, 2011) et sont adaptées à la durée importante de dépollution qui caractérise la phytoremédiation. Beaucoup d'études se sont intéressées à l'utilisation de graminées (*Poaceae*), compte tenu de leur système racinaire fibreux fortement ramifié qui peut s'étendre sur une large surface et pénétrer profondément dans le sol comparé au système racinaire pivotant (Figure 27; Gan *et al.*, 2009; Gaskin, 2008). Aprill et Sims (1990) ont aussi suggéré que les racines fibreuses pouvaient être plus efficaces dans la stimulation des microorganismes de la rhizosphère.

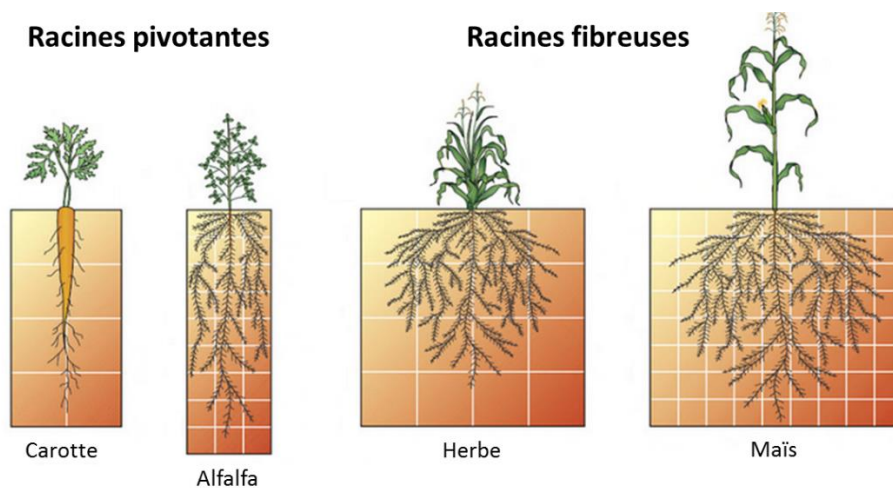


Figure 27. Systèmes racinaires fibreux et pivotants (Herren, 2011).

De plus, les graminées peuvent posséder des tiges horizontales qui poussent au-dessus (stolon) ou en-dessous (rhizome) de la surface du sol ce qui augmente la stabilisation par rapport aux forces érosives (Aprill and Sims, 1990). Ces plantes possèdent également une diversité génétique inhérente qui leur procure un avantage compétitif dans l'adaptation à des conditions environnementales défavorables (Gaskin, 2008). Plusieurs études ont donc montré un effet positif des graminées en phytoremédiation (Günther *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2014; Técher *et al.*, 2012b; Xia, 2004), dont celle de Olson et ses collaborateurs (2007) qui a comparé l'efficacité de remédiation de 8 familles de plantes (*Asclepiadaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Geraniaceae*, *Lamiaceae*, *Polygonaceae*, *Verbenaceae*, *Poaceae*) sur un sol contaminé aux HAP et a démontré une plus grande efficacité des *Poaceae*. D'autres espèces végétales peuvent également se montrer efficaces et sont répertoriées dans le tableau 13.

Tableau 13. Espèces végétales qui se sont montrées efficaces en phytoremédiation sur des sols pollués aux HAP avec en bleu les espèces appartenant à la famille des graminées (Wick et al., 2011).

Espèce végétale	Références
Agropyre de l'Ouest (<i>Agropyron smithii</i>)	Aprill and Sims, 1990; Olson et al., 2007
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	Olson et al., 2007; Pradhan et al., 1998; Reilley et al., 1996; Schwab and Banks, 1994
Aster de la Nouvelle-Angleterre (<i>Aster novae-angliae</i>)	Rugh et al., 2004
Barbon de Gerard (<i>Andropogon gerardii</i>)	Aprill and Sims, 1990; Olson et al., 2007; Rugh et al., 2004; Schwab and Banks, 1994
Blé tendre (<i>Triticum aestivum</i>)	Kuceroová et al., 2001
Boutelou gracieux (<i>Bouteloua gracilis</i>)	Aprill and Sims, 1990
Buchloé faux-dactyle (<i>Buchloe dactyloides</i>)	Qiu et al., 1997
Carotte (<i>Daucus carota</i>)	Wild and Jones, 1992b
Chiendent de bœuf (<i>Stenotaphrum secundatum</i>)	Nedunuri et al., 2000; Schwab and Banks, 1994
Chiendent pied de poule (<i>Cynodon dactylon</i> L.)	Ferro et al., 1994; McCutcheon and Schnoor, 2004; Olson et al., 2007
Elyme du Canada (<i>Elymus canadensis</i>)	Aprill and Sims, 1990
Eupatoire pourpre (<i>Eupatorium purpureum</i>)	Rugh et al., 2004
Fétuque élevée (<i>Festuca arundinaceae</i> Schreb.)	Banks et al., 1999; Chen et al., 2003; Ferro et al., 1994; Günther et al., 1996; Huang et al., 2004; McCutcheon and Schnoor, 2004; Olson et al., 2007; Reilley et al., 1996; Robinson et al., 2003; Schwab and Banks, 1994; Wrenn and Venosa, 1996
Geranium visqueux (<i>Geranium viscosissimum</i>)	Olson et al., 2007
Herbe à balais (<i>Schizachyrium scoparium</i>)	Aprill and Sims, 1990; Pradhan et al., 1998
Herbe makarikari (<i>Panicum coloratum</i>)	Olson et al., 2007; Qiu et al., 1997; Wrenn and Venosa, 1996
Hystrix étalé (<i>Hystrix patula</i>)	Rugh et al., 2004
Lotier corniculé (<i>Lotus corniculata</i>)	Olson et al., 2007
Mélicot jaune (<i>Melilotus officinalis</i>)	Olson et al., 2007
Orge (<i>Hordeum vulgare</i>)	Kuceroová et al., 2001
Panic érigé (<i>Panicum virgatum</i>)	Aprill and Sims, 1990; Chen et al., 2003; Pradhan et al., 1998; Reilley et al., 1996; Rugh et al., 2004
Peuplier hybride (<i>Populus deltoides x nigra</i>)	Jordahl et al., 1997
Pied de dindon (<i>Bouteloua curtipendula</i>)	Aprill and Sims, 1990
Ray-grass anglais (<i>Lolium perenne</i> L.)	Binet et al., 2000a; Günther et al., 1996; Nedunuri et al., 2000; Olson et al., 2007; Wrenn and Venosa, 1996
Ray-grass d'Italie (<i>Lolium multiflorum</i>)	McCutcheon and Schnoor, 2004; Rezek et al., 2008; Schwab and Banks, 1994

Espèce végétale (suite)	Références (suite)
Scirpe vert sombre (<i>Scirpus atrovirens</i>)	Rugh <i>et al.</i> , 2004
Sorgo commun (<i>Sorghum bicolor</i>)	Nedunuri <i>et al.</i> , 2000; Reilley <i>et al.</i> , 1996; Schwab and Banks, 1994
Spartine pectinée (<i>Spartina pectinata</i>)	Rugh <i>et al.</i> , 2004
Spirée blanche (<i>Spiraea alba</i>)	Rugh <i>et al.</i> , 2004
Tournesol (<i>Helianthus annuus</i>)	Olson <i>et al.</i> , 2007
Tournesol de Maximilien (<i>Helianthus maximiliani</i>)	Olson <i>et al.</i> , 2007
Trèfle des prés (<i>Trifolium pratense</i>)	Olson <i>et al.</i> , 2007
Verge d'or rigide (<i>Solidago rigida</i>)	Olson <i>et al.</i> , 2007

Pour améliorer la phytoremédiation, il est possible de combiner plusieurs espèces végétales (Mohan *et al.*, 2006) ou d'utiliser des plantes transgéniques. Celles-ci reçoivent des gènes pouvant provenir de différents organismes comme des bactéries, des champignons, des animaux ou des plantes et qui ont la capacité de dégrader le polluant cible. Les gènes sont introduits *via* la bactérie *Agrobacterium* ou par des méthodes de transfert direct de gène (Eapen *et al.*, 2007) et sont surexprimés dans la plante. Cette dernière doit donc absorber le polluant afin de l'éliminer. C'est pourquoi, l'approche la plus récente et la plus prometteuse est de produire des plantes qui augmentent leur sécrétion d'enzymes capables de dégrader les polluants dans la rhizosphère (Abhilash *et al.*, 2009; Gerhardt *et al.*, 2009). Cependant, l'utilisation de plantes transgéniques sur le terrain est soumise à des restrictions réglementaires strictes et les expériences sont seulement réalisées en laboratoire ou en serre (Gerhardt *et al.*, 2009).

1.5. *Miscanthus x giganteus*

1.5.1. Présentation

Miscanthus x giganteus (MxG) est une plante pérenne rhizomateuse originaire d'Asie du sud-est (Hromádka *et al.*, 2010). Le genre *Miscanthus* appartient à la famille des *Poaceae*, sous-famille des *Panicoidae*, tribu des *Andropogoneae* et sous-tribu des *Saccharineae* (Chou, 2009). La figure 28 représente la répartition des principales espèces de *Miscanthus* dans le monde.

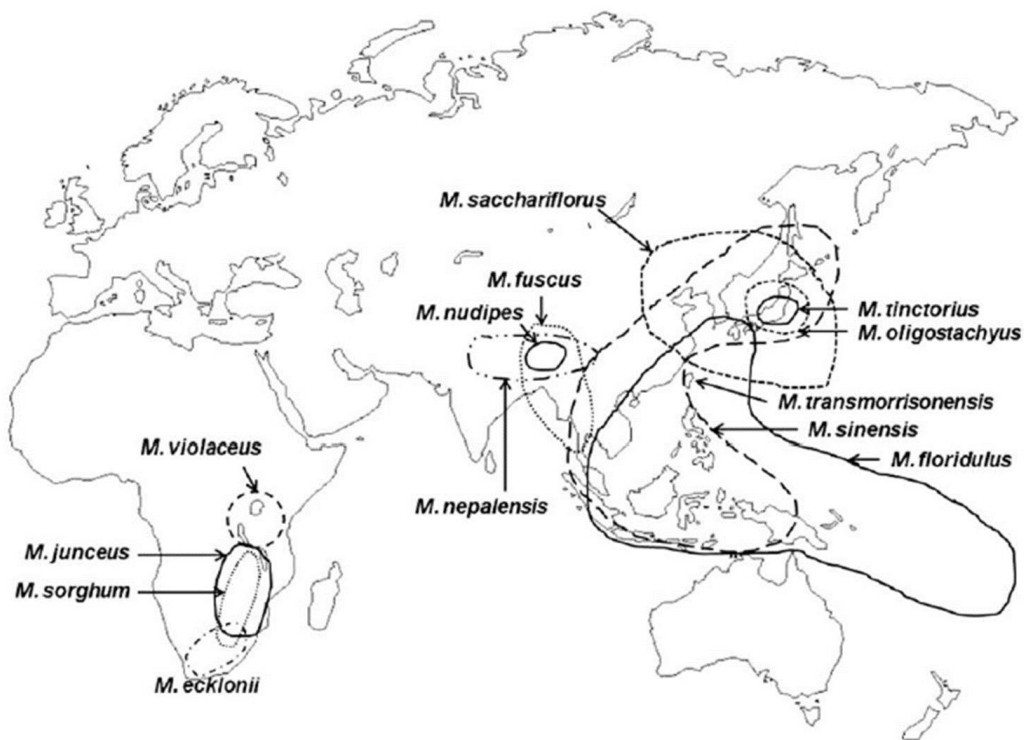


Figure 28. Distribution des différentes espèces de *Miscanthus* dans le monde. Seules les zones de distribution majeures sont représentées (Hodkinson et al., 2002).

Ces plantes ont longtemps été utilisées pour le pâturage et les matériaux de structure en Chine et au Japon (Stewart et al., 2009). Ce n'est qu'en 1935 qu'Aksel Olsen a importé un hybride stérile de *Miscanthus* du Japon au Danemark dans un intérêt horticole (Hromádka et al., 2010; Linde-Laursen, 1993). Il s'agissait de MxG qui est un hybride stérile triploïde entre *Miscanthus sacchariflorus* (diploïde) et *Miscanthus sinensis* (tétraploïde) (Linde-Laursen, 1993). D'autres noms existent pour cette plante comme *Miscanthus Anderss*, *Miscanthus Sinensis 'Giganteus'*, *Miscanthus 'Giganteus'*, *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus' (Linde-Laursen, 1993) ou encore *Miscanthus x giganteus* GREEF et DEU (Lewandowski et al., 2000). Depuis les années 1980, sa culture s'est étendue en Europe car elle est étudiée en tant que plante potentiellement bioénergétique (Chung and Kim, 2012). De nombreux programmes ont donc vu le jour depuis 1983 et les plus importants sont présentés sur la figure 29.

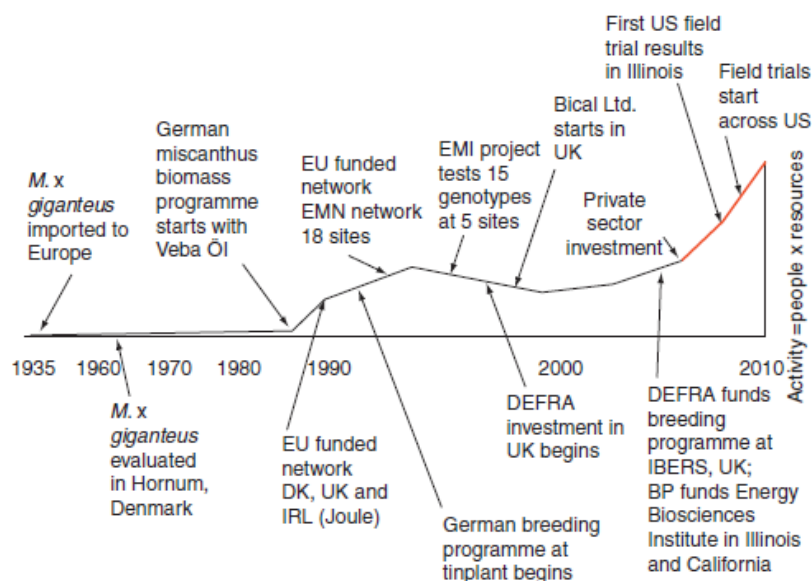


Figure 29. Calendrier des programmes clés dans l'investigation de *Miscanthus* en tant que plante bioénergétique (Heaton et al., 2010).

MxG possède un métabolisme photosynthétique de type C4 ce qui lui procure l'avantage d'avoir un meilleur rendement que les plantes en C3 car elles utilisent de façon plus efficace les radiations (Beale and Long, 1995) en convertissant 40 % fois mieux l'énergie solaire en biomasse (Chung and Kim, 2012) mais aussi en utilisant plus efficacement l'eau (Beale et al., 1999; Chung and Kim, 2012) et l'azote (Chung and Kim, 2012; Lewandowski et al., 2000). Cependant, les plantes en C4 nécessitent des températures plus chaudes que les plantes en C3 pour initier la croissance des pousses (Long, 1983), ce qui n'est pas le cas de MxG. En effet, son mécanisme photosynthétique apparaît plus adapté aux faibles températures que les autres plantes en C4 lui permettant d'obtenir une bonne productivité, même sous des températures plus basses, grâce au maintien de son haut taux de photosynthèse et de l'activité des enzymes associées (Wang et al., 2008). Ceci pourrait être expliqué par le fait que *Miscanthus sacchariflorus* a fourni au génome de MxG une adaptation aux climats chauds alors que *Miscanthus sinensis* lui a fourni des ressources génétiques pour les régions plus froides (Jørgensen, 1997).

1.5.2. Culture

Du fait de sa stérilité, la plantation de MxG peut être réalisée à partir de rhizomes ou de plantules. Les rhizomes sont obtenus par la technique de division du rhizome qui consiste à

les séparer en petits morceaux (Figala *et al.*, 2015; Heaton *et al.*, 2010; Lewandowski *et al.*, 2000). Pour ce faire, les rhizomes dormants d'une plantation de 2 ou 3 ans sont coupés en utilisant un cultivateur rotatif ou une herse rotative et les nouveaux morceaux obtenus sont récoltés et plantés (Carton *et al.*, 2008; Lewandowski *et al.*, 2000; Nijskens, 2001). Selon les conditions du sol, une multiplication des plantes d'un facteur 30 à 40 peut être réalisée de cette façon sur une période de 2 à 3 ans (Carton *et al.*, 2008; Nijskens, 2001). Concernant les plantules, celles-ci peuvent être obtenues en repotant des petits segments de rhizomes obtenus par division du rhizome (Heaton *et al.*, 2010) ou en utilisant la technique de micropropagation (Figala *et al.*, 2015; Heaton *et al.*, 2010). Cette dernière consiste à utiliser plusieurs tissus de MxG afin d'initier des cultures *in vitro* qui, ensuite, peuvent être multipliés et régénérés en plante entière (Holme and Petersen, 1996; Kim *et al.*, 2010). La méthode de micropropagation permet d'obtenir des taux de multiplication supérieurs à celle de la division du rhizome (jusqu'à un facteur 2000) (DEFRA, 2001) mais les plants sont beaucoup plus sensibles lors du premier hiver avec un plus faible taux de survie (Lewandowski *et al.*, 2000). En effet, l'avantage de la division du rhizome est qu'il prend place pendant que la plante est en dormance et est moins sensible aux changements climatiques (Pyter *et al.*, 2010). Aussi, cette méthode est plus favorable en termes de croissance, de rendement en matière sèche (Pyter *et al.*, 2010) et de coûts (DEFRA, 2001; Heaton *et al.*, 2010; Lewandowski *et al.*, 2000). Cependant, ces deux méthodes restent bien plus difficiles à mettre à place et plus onéreuses que celles réalisées à partir de semences, du fait notamment du peu d'équipements spécialisés existants (Lewandowski *et al.*, 2000; Pyter *et al.*, 2010). Les coûts élevés pendant la première année d'implantation sont toutefois compensés par les caractéristiques pérennes de MxG car il n'y aura pas plus de dépenses nécessaires pour les 10 années à venir (Chung and Kim, 2012).

La plantation idéale correspond à la période de mars à avril lorsque le risque de fortes gelées est passé. Pour les plantules *in vitro*, la période idéale sera vers la mi-mai lorsque la température atteint 15°C en journée (Gauthier and Somer, 2013). La figure 30 présente le cycle de croissance annuel typique de MxG.

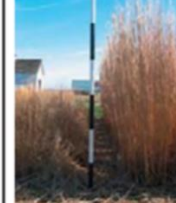
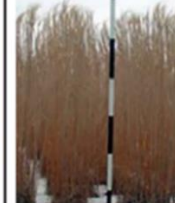
Avril	Mai	Août/ septembre	Novembre	Décembre	Février
Emergence	Fermeture du couvert	Biomasse maximale	Sénescence	Séchage	Hivernage
					

Figure 30. Cycle annuel typique de croissance de MxG (Heaton *et al.*, 2010).

Lorsque des rhizomes sont plantés, les pousses émergent au début du printemps lorsque les températures du sol varient entre 6 et 10°C (Clifton-Brown and Jones, 1997; Heaton *et al.*, 2010). La biomasse s'accumule rapidement pendant l'été avec un pic autour de septembre (Beale and Long, 1997). Selon le développement de la culture, les plants sont récoltés annuellement après 2 ou 3 ans d'implantation car la production de la biomasse, la première année, n'est pas assez importante (Gauthier and Somer, 2013). La récolte est généralement réalisée après la période de sénescence (récolte en sec) lorsque les plants sont secs et les éléments nutritifs remobilisés vers le rhizome (Beale and Long, 1997; Heaton *et al.*, 2010). Au cours de la sénescence, 30 à 50 % de la matière sèche récoltable peut être perdue lors de la chute des feuilles (Heaton *et al.*, 2010) mais elles permettent de limiter la pousse des adventices, d'isoler le sol d'un point de vu thermique et hydrique (Gauthier and Somer, 2013) et d'apporter de la matière organique au sol (Beale and Long, 1997). De plus, pour ce type de récolte, c'est principalement la tige qui est valorisée. La translocation des nutriments vers le rhizome permet d'assurer un approvisionnement en éléments nutritifs pour la prochaine saison ce qui réduit les besoins en fertilisant (Beale and Long, 1997; Himken *et al.*, 1997; Lewandowski and Kicherer, 1997). Il a été estimé que 21 à 46 % de l'azote, 36 à 50 % du phosphore, 14 à 30 % du potassium et 27 % du magnésium sont transloqués des pousses au rhizome (Himken *et al.*, 1997). De plus, cela minimise la présence de composés inorganiques dans les parties aériennes récoltables qui pourraient causer des problèmes de corrosion, d'écumage, d'encrassement et d'émissions lors de la combustion (Beale and Long, 1997). En revanche, des polluants peuvent être émis dans l'atmosphère, si en présence d'un

sol contaminé, ceux-ci ont été absorbés par les plants. Dans ce cas, des filtres peuvent être mis en place pendant la combustion. La récolte peut aussi être réalisée à la fin de l'été (récolte en vert) lorsque les rendements de biomasse sont les plus élevés (Heaton *et al.*, 2010). Cependant, les plants sont humides et doivent être séchés ou utilisés en valorisation autre que la combustion et la présence des éléments nutritifs dans la tige et les feuilles nécessite, pour la saison de croissance suivante, un apport de fertilisant (Gauthier and Somer, 2013; Heaton *et al.*, 2010).

Durant toute sa durée de vie, qui est estimée à 20-25 ans (Hromádko *et al.*, 2010) sur des terres agricoles, MxG va se développer par bourgeonnement du rhizome et apporter chaque année de nouvelles pousses qui vont émerger durant le mois d'avril (Figala *et al.*, 2015; Gauthier and Somer, 2013). Le nombre de tiges est très variable selon les plants, entre 30 et 80, mais certaines peuvent régresser ou disparaître à cause de la concurrence pour la lumière (Vandendriessche, 2007). La culture peut finir par atteindre 4 m de haut (Hromádko *et al.*, 2010) et le système racinaire peut aller jusqu'à 2,5 m de profondeur (Neukirchen *et al.*, 1999). La panicule florale de la plante va pouvoir aussi se développer mais il n'émet pas de gamétocytes (Linde-Laursen, 1993; Quinn *et al.*, 2010). La période de floraison est souvent associée avec le début de la sénescence et l'absorption des nutriments (Chung and Kim, 2012).

En ce qui concerne l'entretien de la culture de MxG, un contrôle des adventices va être nécessaire durant sa première année de plantation car elle ne va pas s'avérer très compétitive (Lewandowski *et al.*, 1995, 2000). Pour limiter l'utilisation d'herbicides, le paillage qui consiste à recouvrir le sol avec des matériaux d'origine végétale ou minérale, peut être utilisé. La chute des feuilles de MxG permettra par la suite de limiter la pousse des adventices. Au bout de 2 ou 3 ans lorsque la culture sera bien établie, ce contrôle ne sera plus nécessaire (Lewandowski *et al.*, 2000). Bien qu'aucun insecte ravageur ou aucune maladie n'aient été reportés comme affectant significativement la production de MxG (Chung and Kim, 2012; Lewandowski *et al.*, 2000) les risques potentiels restent élevés, notamment à cause de son manque de diversité génétique car MxG est issu d'un seul clone (Chung and Kim, 2012). Parmi les très peu d'insectes pouvant s'attaquer à MxG (Prasifka *et al.*, 2009), il existe la larve de papillon de nuit *Mesapamea secalis* L. qui se nourrit de ses tissus au printemps (Christian *et al.*, 1997). Concernant ses pathogènes, ils sont beaucoup

plus nombreux et sont représentés par le champignon *Fusarium* (Thinggaard, 1997), le virus de la jaunisse nanisante de l'orge (Christian *et al.*, 1994), le mildiou de *Miscanthus* causé par *Leptosphaeria* sp. (O'Neill and Farr, 1996), le virus de la mosaïque de la canne à sucre (Agindotan *et al.*, 2009) ou encore les champignons *Pithomyces chartarum* (Ahonsi *et al.*, 2010) et *Ephelis japonica* (Tsukiboshi *et al.*, 2008). Cependant, en raison de sa forte résistance (Chung and Kim, 2012; Lewandowski *et al.*, 2000), la culture de MxG nécessite très peu de pesticides. Comme cela a été énoncé précédemment, les besoins en fertilisants ne sont pas nécessaires après 2 ou 3 ans d'implantation mais ceux-ci peuvent être ajoutés de manière préventive lors de la première année de croissance. Un des autres avantages de MxG est qu'elle peut pousser sur une grande variété de sols, comme des sols pauvres ou contaminés, sans la nécessité d'un apport en nutriments minéraux (Lewandowski *et al.*, 2003). Une bonne structure des agrégats du sol, caractérisée par le volume des pores et la distribution des tailles, serait plus importante que le type de sol ou le pH pour la croissance de MxG (Heaton *et al.*, 2010). Les sols les plus favorables doivent avoir une texture intermédiaire qui permet une bonne circulation de l'air, une grande capacité de rétention en eau et une haute teneur en matière organique (Heaton *et al.*, 2010). Afin de minimiser les interférences avec les cultures à vocation alimentaire, les espèces de *Miscanthus* sont de plus en plus cultivées sur des terres marginales, souvent mises de côté en raison des mauvaises conditions du sol et des faibles rendements économiques (Dufossé *et al.*, 2014). Toutefois, pour des raisons économiques, des cultures peuvent s'implanter sur des sols de bonne qualité appropriés pour la production alimentaire (Dufossé *et al.*, 2014).

Toutes les caractéristiques qui font de MxG une matière première idéale pour la production d'énergie (forte production de biomasse, culture peu contraignante, pérennité,...), ont été suggérées comme étant des caractéristiques d'espèce invasive (Raghu *et al.*, 2006). L'inquiétude d'une invasion repose sur le fait que les deux parents de MxG, *Miscanthus sinensis* et *Miscanthus sacchariflorus* présentent des risques particulièrement élevés d'invasion (Bonin *et al.*, 2014; Quinn *et al.*, 2010, 2011). Cependant, contrairement à ces deux espèces, MxG est stérile, produisant des graines non viables et se reproduisant par bouturage du rhizome. Matlaga et Davis (2013) soulignent aussi le fait que les machines agricoles peuvent provoquer une fragmentation des rhizomes, envahissant alors les bords des champs et pouvant être dispersés lors d'inondations. Cependant, MxG a été étudiée

depuis plus de 10 ans en Europe pour des recherches sur les bioénergies et aucun cas d'invasion n'a été signalé dans les écosystèmes naturels ou cultivés (Pyter *et al.*, 2010).

1.5.3. Productivité

Les données de productivité énoncées ci-dessous concernent des chiffres obtenus à partir de culture sur des sols non pollués.

La durée nécessaire à une plantation de MxG pour donner son rendement maximum peut prendre de 3 à 5 ans en fonction des conditions environnementales, avec une augmentation de rendement d'année en année (Collura *et al.*, 2006; Lewandowski *et al.*, 2000). En effet, la productivité va dépendre notamment de la disponibilité en eau pendant la période de croissance, avec une amélioration de sa production de biomasse lors de précipitations comme pour toutes autres cultures (Chung and Kim, 2012). Une fois que son rendement maximal est atteint, celui-ci va rester stable avec des valeurs allant de 20 à 50 t.ha⁻¹.an⁻¹ de matière sèche pour les récoltes précoces (au pic de biomasse en automne) et de 10 à 30 t.ha⁻¹.an⁻¹ pour les récoltes tardives (allant de l'hiver au printemps) (Clifton-Brown *et al.*, 2000; Clifton-brown *et al.*, 2004; Lewandowski *et al.*, 2000). Les rendements tendent tout de même à diminuer 15-20 ans après l'implantation de la culture (Dufossé *et al.*, 2014). La teneur maximale en biomasse sèche potentielle peut être de plus de 20 t.ha⁻¹.an⁻¹ en Europe centrale et entre 30 et 40 t.ha⁻¹.an⁻¹ dans le sud de l'Europe (Chung and Kim, 2012). La figure 31 présente les différents teneurs en biomasse obtenues en Europe et aux Etats Unis au cours d'un cycle végétatif de MxG. Les rendements des plants récoltables peuvent aller de 4 à 49 Mg.ha⁻¹ ce qui fait de MxG une des plantes terrestres les plus productives des régions tempérées (Chung and Kim, 2012; Heaton *et al.*, 2010) et la France apparaît comme le pays possédant le meilleur rendement. Dohleman et Long (2009) ont montré que MxG était 60 % plus productive que le maïs, une autre plante en C4 également utilisée en bioénergie. Le genre *Miscanthus* s'avère également beaucoup plus productif que le peuplier (C3), le saule (C3), la paille de blé (C3) ou le panic érigé (C4) d'autres plantes bioénergétiques (Chung and Kim, 2012).

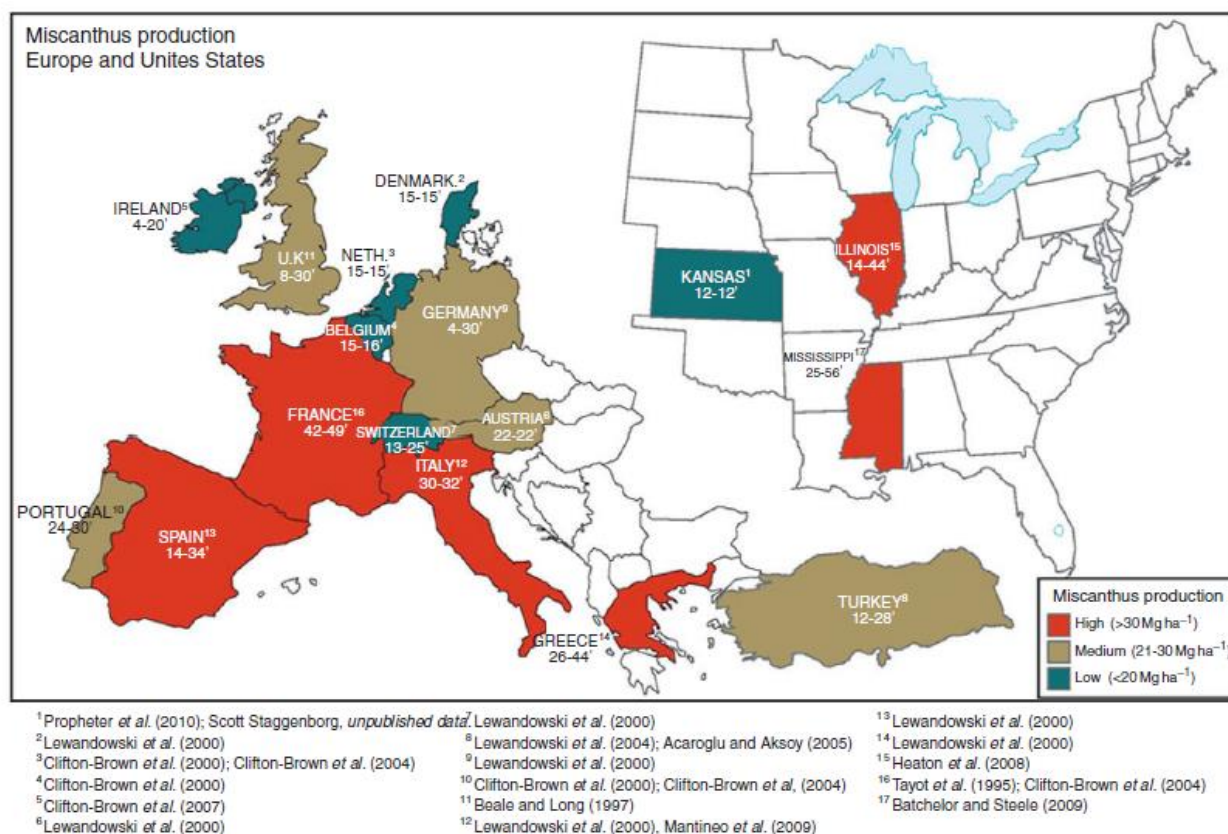


Figure 31. Gammes de rendements de biomasse obtenus pour MxG au cours d'essais en Europe et aux Etats Unis (Heaton *et al.*, 2010).

1.5.4. Valorisation

MxG est utilisée en tant que culture économique à valorisation non énergétique pour la production de pâte à papier, de compost, de géotextile, de matériaux de construction comme les panneaux de particules pressées, de litière animale ou encore pour la fabrication de biocomposites (Cappelletto *et al.*, 2000; Fernando *et al.*, 2004; Figala *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2005; Lewandowski *et al.*, 2000; Marín *et al.*, 2009; Venturi *et al.*, 1998).

Du fait de sa forte production de biomasse et de son faible besoin en nutriment, MxG a un fort potentiel en tant que plante énergétique (Pyter *et al.*, 2010). La majorité de la biomasse de *Miscanthus* est constituée de lignocellulose et peut être transformée en bioéthanol, un biocarburant, en utilisant différentes technologies de pointe (Han *et al.*, 2011). Selon l'étude de Collura et ses collaborateurs (2006), son rendement énergétique net a été évalué entre 152 et 236 MJ.ha⁻¹.an⁻¹, prouvant que MxG est une plante prometteuse pour la production de carburant. Grâce à un pouvoir calorifique allant de 17 à 20 MJ.kg⁻¹, la biomasse de MxG

peut également être utilisée pour la production de chaleur (Brosse *et al.*, 2012; Collura *et al.*, 2006) et même en co-combustion avec du bois ou du charbon (Wagenaar and Van den Heuvel, 1997). Différents sous-produits peuvent aussi servir de matière première pour de nombreuses industries chimiques biosourcées (Villaverde *et al.*, 2010). Récolté « vert », *Miscanthus* peut être valorisé dans des unités de biométhanisation, avec un pouvoir méthanogène évalué à plus de 200 000 MJ.ha⁻¹ (Gauthier and Somer, 2013). La figure 32 présente les différents produits finis de *Miscanthus* et leurs différentes utilisations selon les procédés de transformation employés.

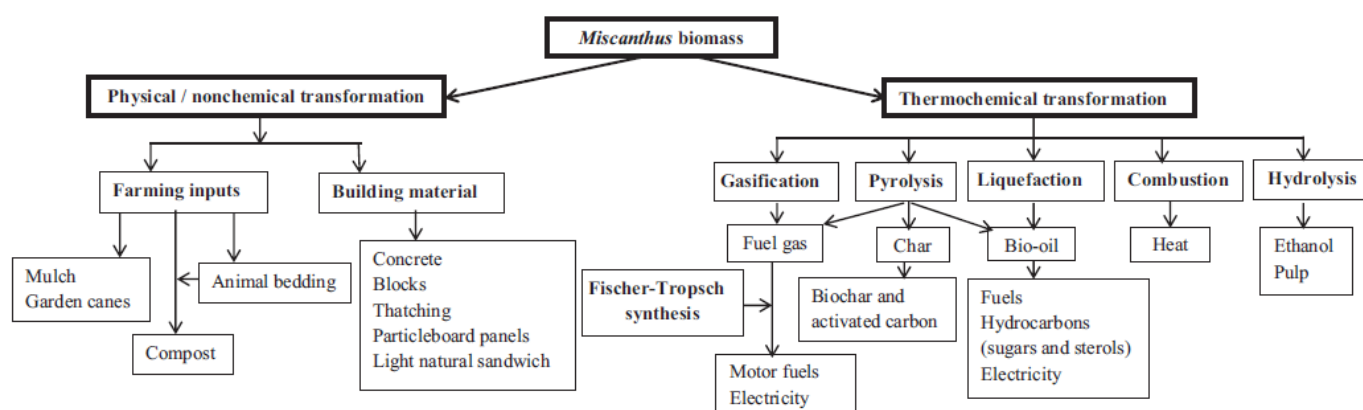


Figure 32. Voies de transformation de la biomasse de *Miscanthus* et leurs produits (Nsanganwimana *et al.*, 2014).

1.5.5. Phyto/rhizoremédiation

MxG peut être utilisée en tant que plante phytoremédiatrice puisqu'elle possède la capacité de se développer sur des sols contaminés (Hartley *et al.*, 2009; Técher *et al.*, 2012b; Wanat *et al.*, 2013). De plus, grâce à son système racinaire pouvant aller jusqu'à 2,5 m de profondeur et montrant une plus grande densité dans des profondeurs d'environ 30 cm (Neukirchen *et al.*, 1999), MxG semble être la candidate idéale. Dans la littérature, la plupart des études concernent des sols pollués par des éléments traces (Firmin *et al.*, 2015; Hartley *et al.*, 2009; Korzeniowska and Stanislawska-Glubiak, 2015; Pavel *et al.*, 2014; Wanat *et al.*, 2013) et très peu par des HAP. Técher et ses collaborateurs (2012b) ont montré une bonne adaptation physiologique de MxG à des sols pollués par divers HAP dont les concentrations allaient de 26 à 364 mg.kg⁻¹ de sol sec, que ce soit en laboratoire ou au champ. Dans cette étude, la présence de la plante a induit une faible diminution des HAP tétracycliques (pyrène, BaA, et chrysène). L'exposition étant réalisée sur une durée de seulement 136

jours, cette dissipation pourrait s'avérer plus importante sur le long terme, ce qui laisse suggérer un effet positif de MxG. Un changement des communautés bactériennes avec une sélection de phylotypes spécifiques à proximité des racines a également été observé, ainsi qu'une amélioration de la qualité du sol grâce à un apport de carbone organique. L'analyse des exsudats racinaires de MxG montre qu'ils sont impliqués dans la biostimulation bactérienne, notamment les composés tels que la rutine et la quercétine (flavonoïdes) (Técher *et al.*, 2011) et qu'ils stimulent l'activité et la densité des bactéries capables de dégrader du pyrène et du phénanthrène (Técher *et al.*, 2012a). Quinze bactéries appartenant au groupe des Protéobactéries ont été identifiées comme les principaux microorganismes impliqués dans leur dégradation, avec une activité deux fois plus importante en présence des exsudats racinaires. Les composés polyphénoliques (acide gallique, acide chlorogénique et caféique) et flavonoïdes (quercétine, rutine et catéchine) présents dans la rhizosphère de MxG sont donc les principaux acteurs de la biostimulation des bactéries dégradantes avec une potentielle dégradation des HAP par co-métabolisme (Técher *et al.*, 2011, 2012a).

1.6. Objectifs de la thèse

Le sol fournit de nombreux services écosystémiques qui sont fondamentaux au bon fonctionnement des écosystèmes et à la vie. Cependant, de multiples facteurs anthropiques comme les activités industrielles ont conduit à des sols dégradés, voire contaminés. Présentant un risque pour l'environnement et la santé humaine, il est devenu urgent de les réhabiliter. De plus, par la suite, ces sites pourront être reconvertis en aménagements urbains comme des logements ou des espaces verts (De Sousa, 2003) préservant ainsi les terres agricoles.

Parmi les polluants retrouvés dans ces sols, les HAP ont beaucoup été étudiés et notamment en remédiation. Toutefois, la plupart des travaux concernent les HAP à faible poids moléculaire tels que le phénanthrène. Or, ceux de haut poids moléculaire comme le BaA sont également très présents dans les sols pollués et à des concentrations souvent plus importantes. En effet, contrairement aux molécules lourdes, les HAP de faible poids moléculaires sont plus facilement dégradables par les microorganismes et sont plus

susceptibles d'être lessivés ou volatilisés au cours du temps. Il est ainsi tout aussi important de s'intéresser à la dissipation des HAP lourds car ils sont plus persistants dans le sol et plus toxiques.

La biodégradation microbienne des HAP étant le phénomène majeur responsable de leur dissipation dans les sols, la phyto/rhizoremédiation, la biostimulation et la bioaugmentation qui permettent de stimuler ce processus, apparaissent comme des stratégies intéressantes de remédiation.

Dans ce contexte, ces travaux de thèse ont consisté à analyser le devenir et le comportement du BaA sous l'influence de MxG (Figure 33), une plante reconnue pour ses effets positifs en phyto/rhizoremédiation, notamment sur les HAP. Ainsi, une première expérimentation en mésocosme a été réalisée sur le long terme (1 an) afin d'étudier l'impact de la plante au niveau de la diversité et de la densité de la microflore tellurique (bactérie et champignon), des différentes formes de biodisponibilité du polluant, ainsi que de la dissipation et de la toxicité de ce dernier. A partir de cette première étude, un consortium bactérien et une souche fongique étant capables de tolérer et/ou dégrader le BaA ont été sélectionnés. Ceux-ci ont ensuite été utilisés en bioaugmentation seuls ou en combinaison avec MxG dans le but d'améliorer la dégradation du BaA. Afin de préciser l'impact des exsudats racinaires de la plante, 4 molécules retrouvées dans ses exsudats : quercétine, apigénine, acide gallique et catéchine (métabolites secondaires), ont été testées en biostimulation seules, en association avec MxG, ou en combinaison avec la bioaugmentation. Etant des analogues structuraux du BaA ou de ses potentiels métabolites de dégradation, cette expérimentation vise à évaluer la dégradation du polluant par co-métabolisme. Ainsi, afin d'étudier l'influence de la bioaugmentation et de la biostimulation sur la dissipation du BaA, une deuxième expérimentation en mésocosme à plus court terme (105 jours) a été effectuée. Des analyses de la toxicité du sol, de la densité et de la diversité de sa microflore (bactérie et champignon), ainsi que du comportement (biodisponibilité) et de la dissipation du polluant ont alors été réalisées.

Ces différentes expérimentations ont été effectuées dans le but d'améliorer les connaissances au niveau de l'influence de la phyto/rhizoremédiation (à long terme) sur des composés à haut poids moléculaire, de l'action des exsudats racinaires (métabolites secondaires) sur la dégradation des HAP, ainsi que d'avoir de meilleures connaissances sur le

BaA en ce qui concerne son devenir dans les sols et sa dégradation microbienne, notamment par l'identification de souches dégradantes.

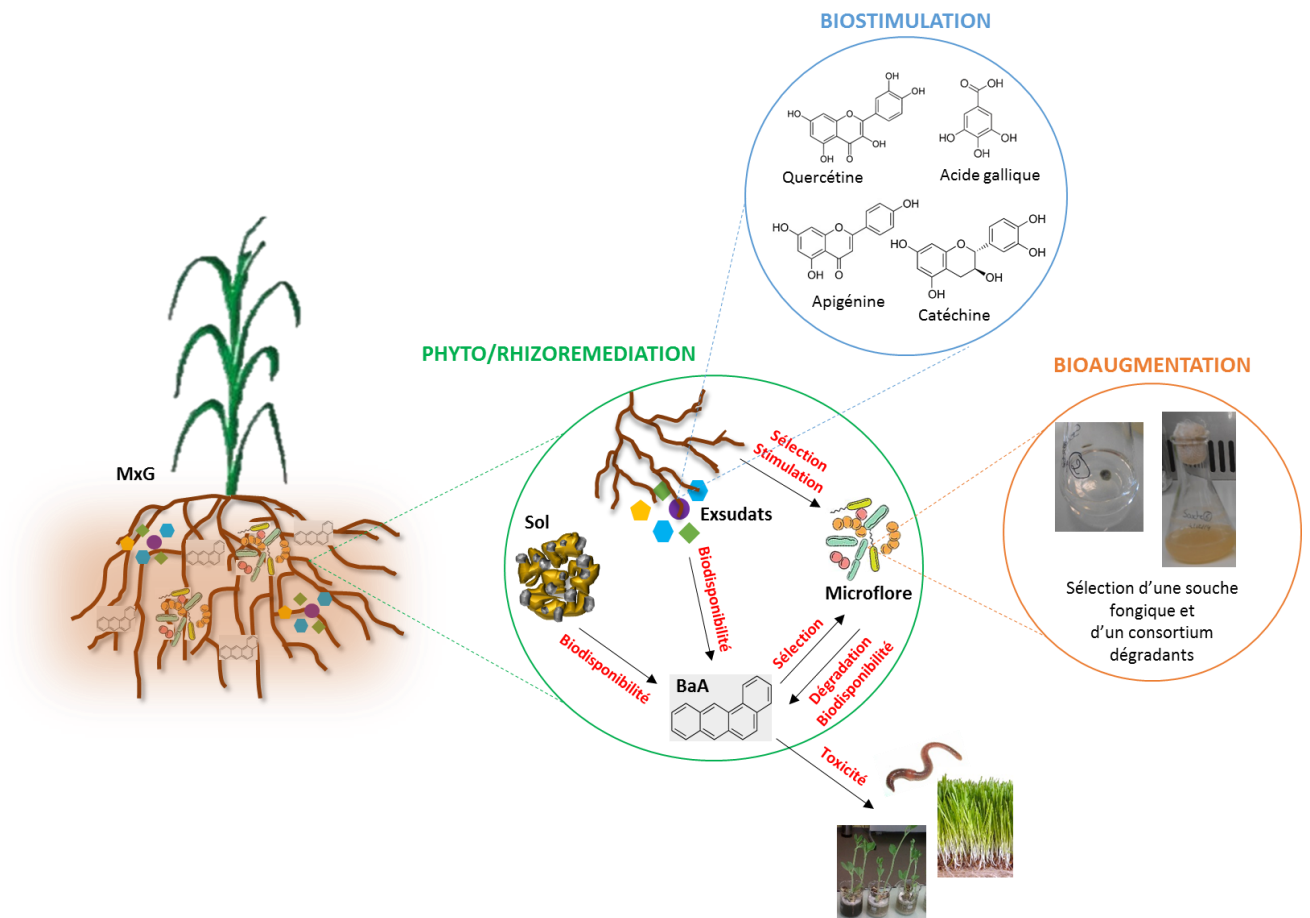


Figure 33. Influence de MxG sur le devenir et le comportement du BaA.

MATERIELS ET METHODES

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Expérience de phyto/rhizoremédiation

2.1.1. Mise en place

2.1.1.1. Préparation des rhizomes de *Miscanthus x giganteus*

Des rhizomes de MxG (partenariat avec le lycée public agricole de Metz Courcelles-Chaussy) ont été lavés à l'eau courante, immergés dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 10 min puis rincés par 7 lavages à l'eau distillée (Figure 34). Les rhizomes ont ensuite été plantés dans du sable de quartz et mis en culture dans une chambre climatique (FITOCLIMA 10000 EHHF, aralab) à 22°C avec 90 % d'humidité relative, des radiations à 350 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et une photopériode jour/nuit de 16h/8h pendant 6 semaines. De l'eau a été apportée régulièrement durant toute cette période. Cette pré-germination a été effectuée afin de s'assurer de la viabilité des rhizomes avant plantation dans le sol.



Figure 34. Préparation des rhizomes de MxG.

2.1.1.2. Préparation du sol et plantation

Afin d'étudier uniquement le BaA et d'éviter d'éventuelles interactions entre la microflore du sol et d'autres composés tels que des polluants ou des molécules d'exsudats racinaires, du sol artificiel (standard) a été utilisé. Celui-ci a été réalisé selon la norme NF EN ISO 11269-2 (2013) et est composé de 10 % de tourbe de sphaigne, 20 % d'argile kaolinite, 69 % de sable de quartz industriel et 1 % de carbonate de calcium. Il est caractérisé par un pH de 8,02 (KCl 1 M) et une capacité maximale de rétention en eau de 32,8 %.

Une partie de ce sol a ensuite été contaminée à une concentration anthropique de 50 mg.kg^{-1} de BaA (pureté 99 %, SIGMA-ALDRICH) dissous dans du dichlorométhane pour constituer le sol pollué. Le dichlorométhane pouvant être une source de carbone non désirée pour cette étude, le sol a été laissé sous sorbonne pour évaporer le solvant et contenir uniquement le BaA.

Trois pots ($\varnothing$ 30 cm $\times$ H 21 cm) par type de sol (non contaminé : SNC ; et contaminé : SC) ont été remplis jusqu'à 3 cm en dessous du bord (environ 8 kg de sol par pot) et MxG a été planté dans deux de ces pots (Figure 35). Le pot restant n'a pas été planté afin de servir de témoin négatif tout au long de l'expérimentation.

Les pots ont été incubés pendant 1 an dans une chambre climatique (FITOCLIMA 10000 EHHF, aralab) à 22°C avec 90 % d'humidité relative, des radiations à $350 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et une photopériode jour/nuit de 16h/8h. Un arrosage automatique a été mis en place et environ 50 mL d'eau filtrée avec du charbon actif, ont été apportés chaque jour.

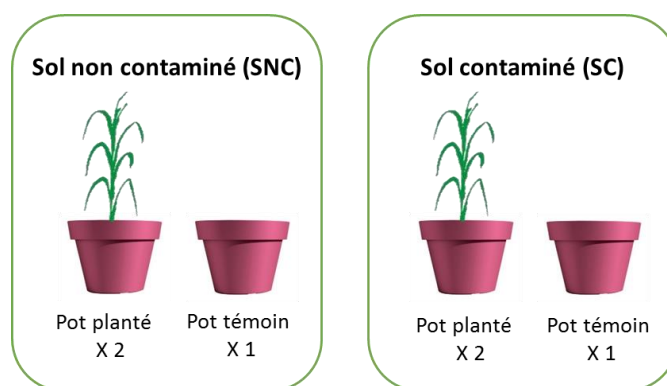


Figure 35. Conditions de plantation de MxG.

2.1.1.3. Paramètres analysés

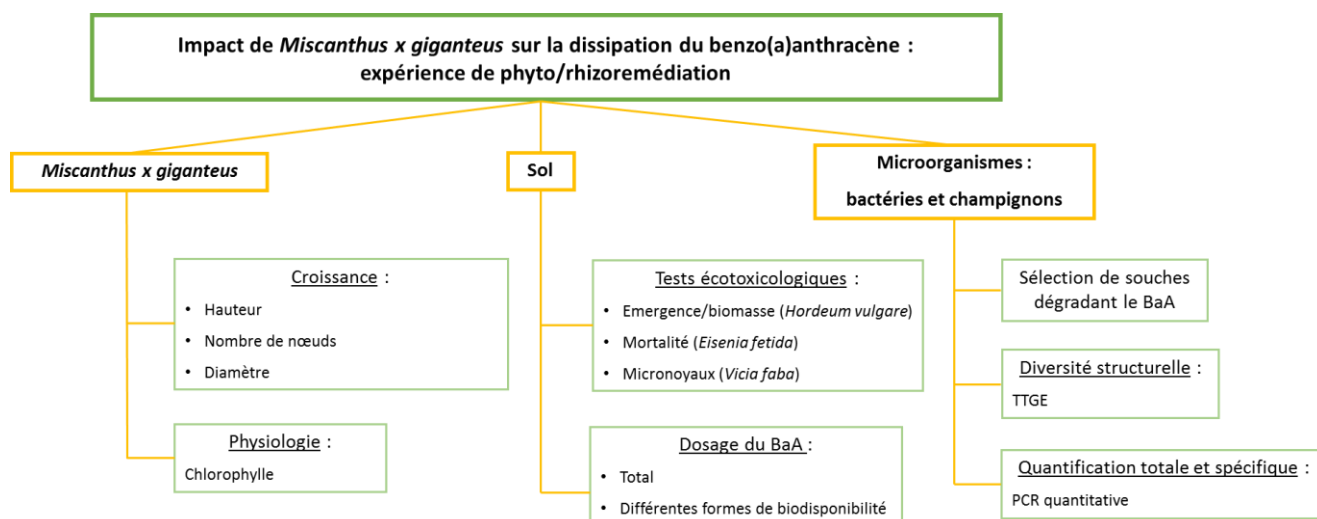


Figure 36. Paramètres analysés lors de l'expérience de phyto/rhizoremédiation.

Toutes les analyses (Figure 36) ont été effectuées avant plantation (T0) ainsi qu'après 6 mois (T6 P) et 12 mois (T12 P) de culture pour chaque type de sol (SNC, SC) après avoir prélevé à chaque temps de prélèvement un des pots plantés. En ce qui concerne les pots témoins (NP), ceux-ci ont été entièrement analysés à la fin de l'expérimentation (T12 NP). Un suivi de la microflore et du BaA a tout de même été réalisé dans ces pots à 6 mois d'exposition (T6 NP) grâce à un prélèvement par carottage.

Au sujet des analyses, des mesures de croissance (hauteur, diamètre, nombre de nœuds) et de physiologie (chlorophylle) ont été effectuées environ tous les mois sur les plants de MxG afin de vérifier la bonne adaptation de la plante au sol pollué. Afin de déterminer le caractère toxique du sol, différents tests d'écotoxicité ont été réalisés dont le test chronique d'émergence et de biomasse avec *Hordeum vulgare* (NF EN ISO 11269-2, 2013), le test aigu de mortalité d'*Eisenia fetida* (NF ISO 11268-1, 2012) et le test génotoxique d'apparition de micronoyaux chez *Vicia faba* (XP CEN ISO/TS 21268-1, 2009). Pour évaluer l'impact de MxG au niveau de la dissipation et du comportement du BaA, un dosage total du polluant a été effectué, ainsi qu'une extraction séquentielle. L'influence de la plante a aussi été analysée au niveau de la microflore du sol (bactérie et champignon) par des techniques microbiologiques et moléculaires. Les méthodes microbiologiques ont été employées afin de sélectionner des souches capables de tolérer et/ou de dégrader le BaA, et les méthodes de biologie

moléculaire ont permis d'analyser la diversité (TTGE, Temporal Temperature Gradient Electrophoresis) et la densité totale (PCR quantitative) des bactéries et des champignons présents dans le sol, ainsi que la densité spécifique de bactéries capables de dégrader les HAP.

2.1.2. Analyses

2.1.2.1. Préparation du sol et mesure d'humidité

Pour les analyses qui ont été réalisées à partir du sol, celui-ci a été préalablement séché à l'air libre puis tamisé à un diamètre de 2 mm afin de travailler sur une terre fine et homogène. Une mesure de son humidité en triplicat a ensuite été réalisée à partir de la norme NF ISO 11465 (1994) pour reporter les résultats de toutes les analyses en poids de sol sec afin qu'ils puissent être comparables. Une prise d'essai de 5 g de sol tamisé a été déposée dans un récipient dont la masse a préalablement été mesurée (m_0). Après avoir déterminé la masse du récipient contenant la prise d'essai (m_1), celui a été placé dans une étuve à 105°C pendant 24h pour sécher le sol. A la sortie de l'étuve, le récipient contenant toujours la prise d'essai a été immédiatement pesé (m_2) puis la teneur en eau du sol (W_{H_2O}) ainsi que sa teneur en matière sèche (W_{dm}) ont pu être déterminées à partir des formules suivantes :

$$WH_2O = \frac{m_1 - m_2}{m_2 - m_0} \times 100$$

$$W_{dm} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Le sol a ensuite été stocké dans un sac hermétique à 4°C avant de pouvoir réaliser le plus rapidement possible les analyses.

2.1.2.2. Analyses de *Miscanthus x giganteus*

Le bon développement des plants de MxG a été évalué à partir de 3 mois (T3) de culture puis tous les mois (sauf à T7) jusqu'à la fin de l'expérimentation (T12). Des mesures de croissance comprenant la hauteur de la tige (du sol au dernier nœud), son diamètre (pied à coulisse à plat sur le bord du pot) et son nombre de nœuds ont été effectuées (Figure 37). Une

évaluation de l'état physiologique des plantes a également été réalisée par mesure directe de la teneur en chlorophylle des feuilles sans les endommager par densité optique (Chlorophyll Meter SPAD-502 Plus, KONICA MINOLTA). Trois mesures consécutives ont été effectuées sur 4 feuilles différentes (les plus en hauteur). Ces mesures permettront d'indiquer un éventuel effet toxique du polluant ou une carence en nutriments du sol.

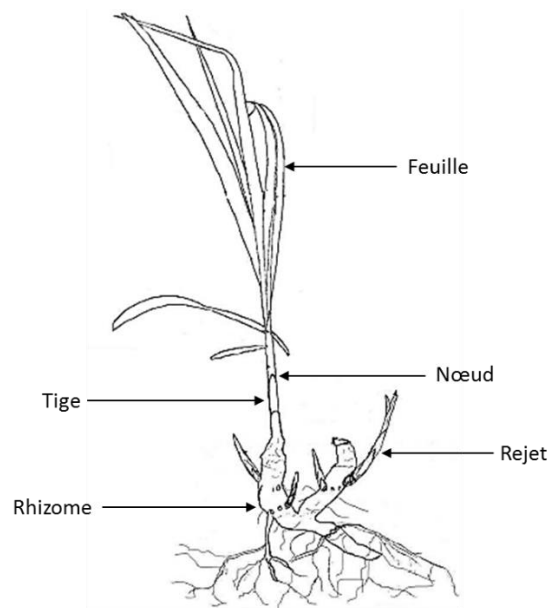


Figure 37. Représentation d'un plant de MxG (Vandendriessche, 2007).

2.1.2.3. Analyses de la microflore du sol

La présence du polluant et de la plante vont certainement modifier la microflore du sol. Ainsi, afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la dissipation du polluant, une étude des microorganismes des sols a été effectuée à partir de leur ADN par des techniques de biologie moléculaire afin d'analyser la structure des communautés par électrophorèse à gradient temporel de température (TTGE), ainsi que leur densité totale (bactérie et champignon) et spécifique (bactéries dégradantes) par PCR quantitative (qPCR). Aussi, des techniques de microbiologie ont été utilisées dans le but de sélectionner des souches ayant la capacité de dégrader le BaA.

2.1.2.3.1. Extraction de l'ADN microbien du sol

Deux méthodes d'extraction d'ADN ont été testées. L'une correspond à une méthode standardisée légèrement modifiée par l'équipe de recherche, développée par Martin-Laurent et ses collaborateurs (2001) et modifiée par Petric et ses collaborateurs (2011) à partir de différents types de sol dont des sols contaminés (méthode 1), alors que l'autre a été précédemment développée au laboratoire par Técher et ses collaborateurs (2010) à partir d'un sol de friche industrielle pollué (méthode 2). Ces techniques étant couramment employées au laboratoire, le but était de sélectionner la plus appropriée au sol utilisé pour ces travaux de thèse. Une méthode d'extraction d'ADN efficace doit permettre une bonne représentativité des microorganismes présents dans le sol. Ainsi, ces deux méthodes ont été comparées en termes de teneur et de pureté en ADN, de densité bactérienne en utilisant la méthode de qPCR et de diversité bactérienne grâce à la technique de TTGE par la réalisation d'un dendrogramme. Suite à ces résultats (paragraphe 3.1.2.), le choix s'est porté sur la méthode 1 à partir de laquelle les analyses de diversité et de densité microbienne ont été effectuées.

Pour la méthode 1, une prise d'essai de 500 mg de sol tamisé à 2 mm a été transférée dans un tube de 2 mL avec des billes de verre de différentes tailles (300 mg de billes d'un diamètre de 106 µm et 2 billes d'un diamètre de 2 mm, SIGMA-ALDRICH) et 1 mL de tampon de lyse (100 mM Tris, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2 % w/v SDS). Après un bead-beating (agitation) de 5 min (vibration fixé, Disruptor Genie, Scientific Industries, SI-D256), les échantillons ont été incubés à 70°C pendant 30 min avec une agitation (vortex) toutes les 10 min pour resuspendre le sol. Afin d'éliminer le sol et les débris cellulaires, les tubes ont été centrifugés (14000 g, 1 min 30 s). Après avoir récupéré le surnageant, les protéines ont été précipitées suite à une incubation dans de la glace pendant 10 min avec 1/10 du volume en acétate de potassium 3 M. Les échantillons ont ensuite été centrifugés (14000 g, 5 min) pour récupérer le surnageant et précipiter l'ADN microbien par l'ajout d'un volume d'isopropanol glacé. Les tubes ont été incubés à -20°C pendant 30 min puis centrifugés (14000 g, 10 min). Le surnageant a été éliminé et l'ADN a été lavé avec 200 µL d'éthanol à 70 %. Après centrifugation (14000 g, 5 min), le culot d'ADN a été séché à température ambiante puis suspendu dans 100 µL d'eau ultra-pure. Pour finir, l'ADN a été purifié à l'aide de colonnes de

PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) et de sépharose 4B (SIGMA-ALDRICH). Les colonnes de PVPP ont été préparées en ajoutant 1-2 cm de poudre de PVPP dans des colonnes à chromatographie Micro-Spin (Micro Bio-Spin columns, BIO-RAD) et 400 µl d'eau ultra pure. Les tubes contenant le PVPP et l'eau ont été centrifugés (4000 g, 2 min) et l'éluat a été éliminé. Cette procédure a été répétée et une centrifugation finale a été réalisée (4000 g, 4 min). Pour les colonnes de sépharose, 1 mL de sépharose 4B a été ajouté dans une colonne à chromatographie Micro-Spin. Les tubes contenant la sépharose ont été centrifugés (6 000 rpm, 2 min) et l'éluat a été éliminé. Les colonnes ont été lavées avec du tampon TE (Tris-EDTA, 500 µl) puis centrifugées (4000 g, 2 min). L'ADN a été purifié premièrement sur la colonne de PVPP (4000 g, 4 min) puis sur la colonne de sépharose 4B (4000 g, 4 min).

Pour la méthode 2, une prise d'essai de 500 mg de sol tamisé à 2 mm a été suspendue dans 800 µL de tampon de lyse (100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, 40 mM Na_2EDTA , 300 mM NaCl, 0,017 % w/v Napp, 1 % w/v SDS) avec du sable de différents diamètres (500 mg de sable fin et 200 mg de sable de quartz), suivi par un bead beating (agitation) de 5 min (vibration fixé, Disruptor Genie, Scientific Industries, SI-D256). Un second bead beating d'une minute a été effectué après l'ajout de 15 µL de bromure de cétrimonium 10 % (CTAB w/v, MERCK-Schuchardt). Les suspensions obtenues ont été centrifugées (12 000 g, 5 min) et les surnageants ont été incubés dans de la glace pendant 2 min après avoir ajouté 0,3 volume/volume d'un mélange de vitamines 1 M (hydrochlorure de pyridoxine 1 M et hydrochlorure de thiamine 1 M, SIGMA-ALDRICH) afin de précipiter les acides humiques. Les échantillons ont été centrifugés (12 000 g, 5 min) et les protéines des surnageants recueillis ont été précipitées par l'ajout de 0,3 volume/volume d'acétate de potassium 5 M. Les échantillons ont été incubés dans la glace pendant 5 min et centrifugés (12 000 g, 5 min). L'ADN a été précipité des surnageants par l'addition de 0,3 volume/volume d'isopropanol. Ces solutions ont ensuite été transférées dans une colonne spin (EZ-10 Spin column, BIO BASIC CANADA INC) et centrifugées (5 400 g, 15 s). L'éluat a été éliminé et les colonnes ont été lavées avec 400 µL d'éthanol à 70 % (5 400 g, 15 s) puis, avec 300 µL d'éthanol à 70 % (5 400 g, 15 s). Enfin, après une centrifugation finale (5 400 g, 1 min), l'ADN a été élué avec 100 µL d'eau ultra pure (5 400 g, 1 min 30).

Trois réplicats ont été effectués par méthode d'extraction et par échantillon. La qualité de l'ADN a été vérifiée sur un gel d'agarose à 1,5 % et a été quantifiée par dosage

spectrophotométrique à 260 nm (BioSpec-nano, SHIMADZU). La pureté de l'ADN a été évaluée en mesurant les ratios A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} .

2.1.2.3.2. TTGE

La structure des communautés bactériennes a été analysée par électrophorèse à gradient temporel de température (DCode Universal Mutation Detection System, BIO-RAD). Cette technique permet de séparer des fragments d'ADN (amplicons) de séquences nucléotidiques différentes dans un gel d'acrylamide partiellement dénaturant (présence d'urée) grâce à un gradient de température. L'augmentation de celle-ci va conduire à une séparation des brins d'ADN des amplicons. En fonction de leur température de fusion qui diffère selon leur contenu en bases azotées G (guanine) et C (cytosine), les amplicons vont migrer plus ou moins loin dans le gel. Grâce à la présence d'un GC clamp qui va permettre de ne pas séparer complètement les deux brins d'ADN, la migration des amplicons finira par être stoppée (Figure 38).

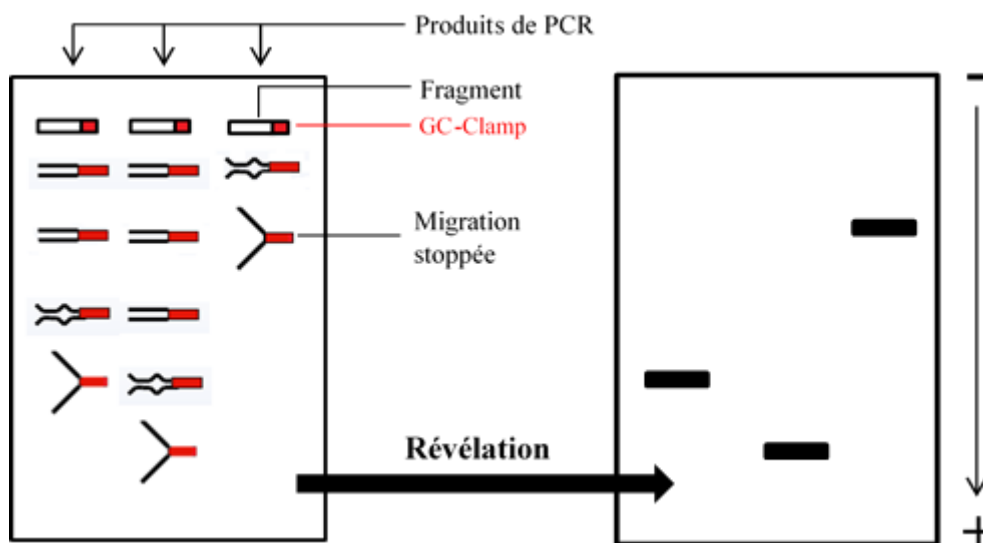


Figure 38. Principe de la TTGE.

La TTGE a été réalisée en ciblant la région variable V3 du gène ARNr 16S. Celle-ci a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces universelles 341F et 534R (Muyzer *et al.*, 1993) avec l'addition d'une queue GC (GC clamp) sur l'amorce 341F pour empêcher la

dénaturation complète des doubles brins d'ADN amplifiés lors de la migration dans le gel (Tableau 18).

Tableau 18. Caractéristiques du couple d'amorces utilisé pour analyser la diversité bactérienne par TTGE.

Communauté	Gène	Amorces	Séquence (5'→ 3')	Taille de l'amplicon (pb)
Bactérienne	ARNr 16S	341F-GC 534R	GC clamp – CCT ACG GGA GGC AGC AG ATT ACC GCG GCT GCT GGC A	193 233 avec GC clamp

Séquence du GC clamp : CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G (40 pb).

Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 50 µL contenant 5 ng d'ADN, du tampon MgCl₂ 1 X (EUROMEDEX), 0,2 mM de dNTP (EUROMEDEX), 32 mg.L⁻¹ de BSA (Sérum Albumine Bovine, EUROMEDEX), 1 U de Taq polymérase (EUROMEDEX) et 0,2 µM de chaque amorce (SIGMA-ALDRICH). Une réaction de PCR a été effectuée pour chaque extraction d'ADN, soit 3 réactions par échantillon.

La réaction de PCR a été réalisée avec le programme suivant (iCycler, BIO-RAD) : 19 cycles avec une étape de dénaturation à 94°C pendant 40 s, une étape d'hybridation à 65°C pendant 30 s et finalement, une étape d'élongation à 72°C pendant 40 s. Puis, 15 cycles d'amplification à 54°C et une étape d'élongation finale à 72°C pendant 5 min.

Pour quantifier les produits PCR, un dosage à 260 nm a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre (BioSpec-nano, SHIMADZU).

La séparation des différents fragments d'ADN a été effectuée sur un gel d'acrylamide/bisacrylamide (7 M d'urée, 2 % v/v de glycerol, 1,25X de TAE, 6 % v/v d'une solution d'acrylamide/bisacrylamide 40 % 29:1, de l'eau ultra pure jusqu'à 30 mL). La réaction de polymérisation du gel a été effectuée par l'ajout de 30 µL de tétraméthyléthylènediamine (TEMED, BIO-RAD) et 330 µL de persulfate d'ammonium 10 % (APS w/v, BIO-RAD). Après polymérisation, le gel a été immergé dans une solution tampon de Tris, Acétate et EDTA (tampon TAE 1,25X). Les produits PCR (20 µL) ont été déposés dans les puits du gel et mis à migrer (110 volts avec un gradient de température allant de 57°C à 67°C avec un incrément de 1,5°C/h). Afin de visualiser les bandes d'ADN, le gel a été coloré avec une solution de nitrate d'argent (3,85 mL HNO₃ 65 %, 0,1 % w/v AgNO₃, eau distillée qsp 250 mL) pendant 7 min sous agitation à 160 tours/min et ensuite avec une solution de

développement (2 % w/v NaOH, 0,04 % Na₂CO₃, 0,5 mL HCOH 33 %, eau distillée qsp 250 mL) pendant 5 puis 30 min minimum sous agitation à 160 tours/min, après avoir été rincé à l'eau distillée. Trois gels ont été effectués par échantillon, soit un gel par réaction de PCR. En ce qui concerne la comparaison des méthodes d'extraction d'ADN, une seule réaction de PCR a été utilisée pour ne réaliser qu'un gel.

Le gel a été photographié (ChemiDoc XRS +, BIO-RAD) puis analysé à l'aide du logiciel PyElph (Pavel and Vasile, 2012) afin de créer une matrice binaire à partir de la présence/absence des bandes sur le gel (phylotypes). A partir de celle-ci, une matrice de dissimilarité calculée grâce à la distance de Jaccard a été réalisée afin de pouvoir analyser la similarité entre les échantillons par positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS). En ce qui concerne la comparaison des méthodes d'extraction d'ADN, le gel a été analysé à partir du logiciel Quantity One (BIO-RAD) afin de réaliser un dendrogramme par méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) selon la présence/absence des bandes pour évaluer la similarité entre les échantillons.

2.1.2.3.3. PCR quantitative

La densité totale bactérienne et fongique ainsi que la densité spécifique de bactéries dégradantes, ont été analysées par qPCR. Le principe de cette technique repose sur le suivi de la réaction d'amplification cycle par cycle par émission d'une fluorescence lorsque du SYBR Green, un agent intercalant de l'ADN fluorescent, est fixé à l'ADN double brin (Figure 39). L'intensité de celle-ci dépend de la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. Lorsque la fluorescence est significativement différente du bruit de fond, la quantité d'amplicons est alors directement corrélée avec la quantité initiale d'ADN.

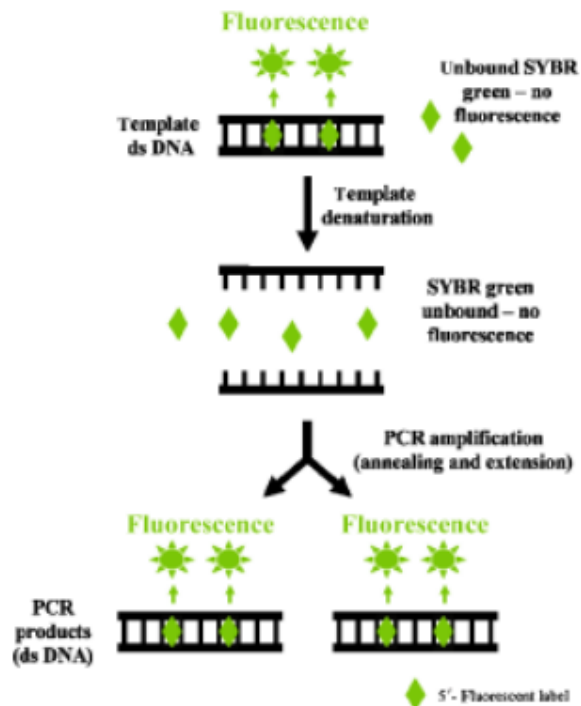


Figure 39. Principe de la qPCR avec du SYBR Green (Smith and Osborn, 2009).

Afin de quantifier le nombre d'amplicons, une gamme étalon a été réalisée au préalable par des techniques microbiologiques mais également moléculaires.

Préparation de la gamme étalon.

La gamme étalon a été réalisée par un clonage du gène d'intérêt à partir d'un produit PCR (insert) (Figure 40).

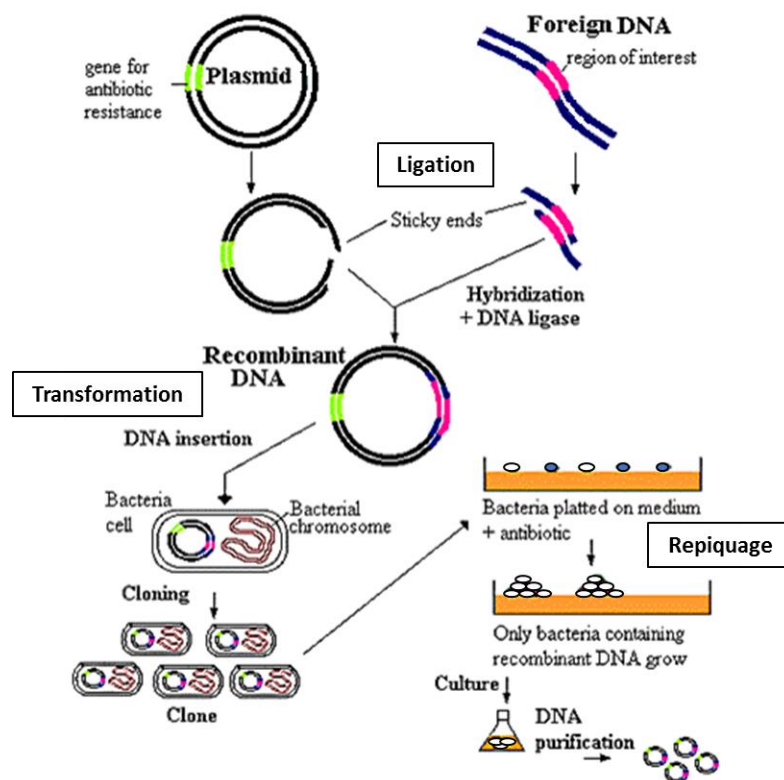


Figure 40. Principe du clonage d'un gène d'intérêt (http://genet.univ-tours.fr/gen001300_fichiers/CHAP5D/GEN05D1EC35A.HTM).

La première étape appelée ligation a consisté à insérer l'insert dans un vecteur (plasmide) d'une taille de 3 kb (pGEM-T Easy, Promega). Les conditions de ligation sont réalisées dans un rapport molaire insert/vecteur de 3:1 avec une quantité de vecteur à 50 ng. Ainsi, la quantité d'insert (Q en ng) à utiliser a été déterminée à partir de la formule suivante :

$$Q = \left[\frac{(\text{quantité du vecteur} \times \text{taille de l'insert})}{\text{taille du vecteur}} \right] \times \left(\frac{3}{1} \right)$$

Puis, grâce à la concentration de l'insert mesurée à 260 nm (BioSpec-nano, SHIMADZU), son volume à utiliser a pu être déterminé. La réaction de ligation a alors été réalisée dans un volume final de 10 µL avec un certain volume d'insert, 50 ng de vecteur, 1 X de tampon de ligation et 3 U de T4 DNA ligase (pGEM-T Easy Vector Systems, Promega). L'échantillon a été incubé une heure à température ambiante puis la ligation a été vérifiée en déposant 3 µL sur gel d'agarose 1,5 % ainsi qu'1 µL de vecteur pour comparer leur taille.

Après cette vérification, le vecteur contenant l'insert a été inséré dans des cellules compétentes, une étape appelée transformation. Deux transformations ont été réalisées à

partir d'1 µL et 4 µL de réaction de ligation. Un volume de 50 µL de cellules compétentes (JM109, Promega) a ensuite été ajouté à la ligation puis les échantillons ont été incubés 20 min dans de la glace. Un choc thermique a été effectué en les incubant à 42°C pendant 50 s puis les échantillons ont été redéposés dans de la glace pendant 2 min. 950 µL de milieu de culture Super Optimal Broth (SOC, Annexe 2) ont été introduits puis les cultures bactériennes ont été incubées à 37°C, sous agitation, pendant 1h30. 100 µL et 500 µL de chaque réaction ont ensuite été étalées sur des boîtes contenant du milieu Lysogeny Broth (LB), de l'ampicilline, de l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) et du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal) (Annexe 3). Celles-ci ont été incubées une nuit à 37°C pour permettre aux bactéries de se développer afin de différencier les clones recombinants par différence de couleur. En effet, dans un premier temps, la présence d'ampicilline dans le milieu va permettre d'éliminer les clones qui n'ont pas été transformés puisque c'est le vecteur qui possède le gène de résistance. Dans un second temps, la présence d'IPTG (inducteur) et de X-Gal (substrat) va induire la production de β-galactosidase, une enzyme codée par le gène LacZ qui se trouve dans le vecteur. Ceci va conduire à une hydroxylation du X-Gal caractérisée par la formation d'un composé de couleur bleu. En revanche, si l'insert est présent dans le vecteur, le gène LacZ est inactivé et il n'y a pas production d'enzyme. Ainsi, les clones transformés et recombinés sont caractérisés par une couleur blanche.

Après avoir vérifié la pureté des clones recombinants par repiquage, une vérification de la taille du fragment cloné a été réalisée par PCR à l'aide des amorces SP6/T7 qui ciblent une région du vecteur dans laquelle se trouve l'insert (Tableau 19).

Tableau 19. Caractéristiques du couple d'amorces utilisé lors du clonage.

Amorces	Séquence (5'→ 3')	Taille de l'amplicon (pb)
SP6 T7	ATT TAGG TGA CAC TAT AG TAA TAC GAC TCA CTA TAG G	Insert + 150

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume de 20 µL contenant 1X de tampon MgCl₂ (EUROMEDEX), 0,2 mM de dNTP (EUROMEDEX), 0,4 U de taq (EUROMEDEX) et 4 µM de chaque amorce (Promega). Les cellules recombinantes ont été introduites dans le mix en

prélevant directement dans la colonie à l'aide d'un cure-dent. La réaction de PCR a été réalisée dans les conditions suivantes : une phase d'activation à 94°C pendant 4 min, puis 35 cycles comprenant une phase de dénaturation à 94°C pendant 45 s, une phase d'hybridation à 55°C pendant 45 s, puis une phase d'élongation à 72°C pendant 1 min 30. Une phase d'élongation finale a ensuite été réalisée à 72°C pendant 7 min.

Les produits PCR ont été déposés sur un gel d'agarose à 1,5 % pour observer la taille des produits PCR.

Après cette vérification, les clones recombinants ont été remis en culture dans 5 mL de milieu LB liquide (Annexe 3) avec de l'ampicilline à 0,1 mg.mL⁻¹ pour maintenir la pression de sélection et ont été incubés 16h à 37°C sous agitation. Le plasmide a ensuite été purifié à l'aide du kit QIAprep Miniprep (QIAprep Miniprep for purification of molecular biology grade DNA, QIAGEN). Les cellules bactériennes ont été récupérées par centrifugation (6800 g, 3 min) après avoir éliminé le surnageant et ont été lysées par l'ajout successif de différents tampons. Le culot a été remis en suspension dans 250 µL de tampon P1 et transféré dans un tube de 1,5 mL. Un volume de 250 µL de tampon P2 a ensuite été ajouté puis après avoir mélangé la solution, 350 µL de tampon N3 ont été introduits. La solution a été mélangée puis une centrifugation a été effectuée (17900 g, 10 min) et le surnageant a été transféré dans une colonne QIAprep spin. Celle-ci a été centrifugée (17900 g, 45 s) pour éliminer les débris cellulaires (éluat) et adsorber l'ADN (le plasmide) sur sa membrane. La colonne a été lavée avec 500 µL de tampon PB puis centrifugée (17900 g, 45 s). Après avoir éliminé l'éluat, la colonne a de nouveau été lavée avec 750 µL de tampon PE puis centrifugée (17900 g, 45 s). L'éluat a été éliminé puis une centrifugation à vide (17900 g, 1 min) a été réalisée pour éliminer le tampon de lavage résiduel. Après avoir placé la colonne dans un nouveau tube, l'ADN a été élué avec 50 µL d'eau ultra-pure (17900 g, 1 min) après une incubation d'une minute à température ambiante.

Pour quantifier l'ADN du plasmide purifié, un dosage à 260 nm a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre (BioSpec-nano, SHIMADZU).

Celui-ci a ensuite été linéarisé par restriction enzymatique afin d'améliorer par la suite les réactions de PCR. En effet, les différentes conformations que peuvent prendre le plasmide peuvent empêcher, par exemple, la fixation des amorces. La réaction de linéarisation a été effectuée dans un volume de 10 µL avec 250 ng de plasmide, 1 X de tampon de restriction

(Promega), 0,1 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ de BSA acétylée (Promega) et 5 U d'enzyme de restriction Sal I (Promega) dont son site n'est pas présent dans l'insert et localisé une seule fois dans le plasmide. L'échantillon a ensuite été incubé pendant 4h à 37°C.

L'ADN du plasmide linéarisé a ensuite été amplifié par PCR afin de vérifier la séquence nucléotidique de l'insert par séquençage. La réaction de PCR a été réalisée en utilisant le couple d'amorces SP6/T7 comme précédemment à partir d'1 μL d'échantillon et dans un volume final de 60 μL . Les produits PCR ont été déposés sur un gel d'agarose à 1,5 % pour vérifier l'amplification et ont été dosés à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (BioSpec-nano, SHIMADZU) puis ont été envoyés à la société GenoScreen pour séquençage.

Après cette vérification, la gamme étalon a été réalisée à partir du plasmide linéarisé. Le poids moléculaire du plasmide contenant l'insert a été déterminé grâce au site internet Oligocalc (Kibbe, 2007) en utilisant la séquence d'ADN obtenue par séquençage. Le nombre de copies de gène (insert) présent par μL (N) dans l'échantillon de plasmide linéarisé a ensuite été déterminé par la formule suivante :

$$N = \left(\frac{\text{Concentration du plasmide}}{\text{Poids moléculaire plasmide} + \text{insert}} \right) \times \text{Nombre d'Avogadro}$$

Une dilution de l'échantillon a été réalisée pour obtenir une solution à 1.10^{10} copies. μL^{-1} puis à partir de celle-ci une dilution en cascade d'un facteur 10 a été effectuée jusqu'à 1.10^0 copies. μL^{-1} .

Réalisation de la qPCR.

La qPCR a été effectuée en utilisant les amorces universelles 341F et 534R (López-Gutiérrez *et al.*, 2004) qui ciblent la région variable V3 du gène ARNr 16S bactérien pour mesurer la densité bactérienne et les amorces Fung5F et FF390R (Lueders *et al.*, 2004) qui ciblent le gène 18S fongique pour quantifier les champignons (Tableau 20). Quant à la quantification des bactéries dégradantes, celle-ci a été réalisée en utilisant les amorces PAH-RHD $_{\alpha}$ GP pour les bactéries à Gram positif (Tableau 20; Cébron *et al.*, 2008). Ces amorces ciblent le gène PAH-RHD $_{\alpha}$ (PAH-ring hydroxylating dioxygenase) qui code pour une dioxygénase, une enzyme impliquée dans la première étape de dégradation des HAP en général. Un couple

d'amorces existe également pour cibler les bactéries à Gram négatif mais aucune amplification n'a été obtenue à partir des différents extraits d'ADN à disposition.

Tableau 20. Caractéristiques des amorces utilisées pour cibler les microorganismes en qPCR.

Communauté	Gène	Amorces	Séquence (5'→ 3')	Taille de l'amplicon (pb)
Bactérienne	ARNr 16S	341F 534R	CCT ACG GGA GGC AGC AG ATT ACC GCG GCT GCT GGC A	193
Fongique	ARNr 18S	Fung5F FF390R	GGG AAC CAG GAC TTT TAC GAG GTC TCG TTC GTT ATC G	550
Bactérienne dégradante à Gram positif	PAH-RHD _α GP	PAH-RHD _α GP F PAH-RHD _α GP R	CGG CGC CGA CAA YTT YGT NGG GGG GAA CAC GGT GCC RTG DAT RAA	292

Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 20 µL contenant 5 ng d'ADN, 1X de tampon Sybr Mix (SSoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, BIO-RAD) et 2 µM de chaque amorce pour le gène ARNr 16S, 0,5 µM de chaque amorce pour le gène ARNr 18S ou 0,4 µM de chaque amorce pour le gène PAH-RHD_α (SIGMA-ALDRICH). Deux réactions ont été effectuées pour chaque extraction d'ADN, soit 6 réactions par échantillon (3x2).

Pour le gène ARNr 16S, les conditions de PCR quantitative (iCycler MyIQ2, BIO-RAD) consistent en une étape d'activation à 98°C pendant 2 min pour l'activation de l'enzyme, puis 35 cycles avec une étape de dénaturation à 98°C pendant 5 s, une étape d'hybridation à 60°C pendant 30 s et une étape d'élongation à 72°C pendant 30 s. Enfin, une courbe de dénaturation de 60°C à 98°C (0,5°C/5 s) est effectuée.

Pour le gène ARNr 18S, les conditions sont : une étape d'activation à 98°C pendant 2 min, puis 35 cycles avec une étape de dénaturation à 98°C pendant 5 s, une étape d'hybridation à 50°C pendant 30 s et une étape d'élongation à 72°C pendant 30 s. Une étape d'élongation finale a ensuite été effectuée à 72°C pendant 5 min. Enfin, une courbe de dénaturation de 60°C à 98°C (0,5°C/5 s) est effectuée.

En ce qui concerne le gène PAH-RHD_α, une étape d'activation à 98°C pendant 2 min a été effectuée, puis 40 cycles avec une étape de dénaturation à 98°C pendant 5 s, une étape d'hybridation à 54°C pendant 30 s et une étape d'élongation à 72°C pendant 30 s. Une étape d'élongation finale a ensuite été réalisée à 72°C pendant 5 min. Enfin, une courbe de dénaturation de 51°C à 98°C (0,5°C/10 s) est effectuée.

Lors du passage des échantillons en qPCR, les points de la gamme étalon ont aussi été ajoutés (de la même manière que les échantillons) afin de quantifier le nombre de copies de gène par ng d'ADN des échantillons. Les résultats ont ensuite été exprimés en nombre de copies par gramme de sol sec. De l'ADN de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1, No. 19880, DSMZ), dont la quantité de gènes ARNr 16S est connue ($5,8 \cdot 10^5$ copies d'ARNr 16S par ng d'ADN), a été utilisé afin de vérifier la calibration du thermocycleur, lors de chaque analyse, par le calcul d'un rendement, celui-ci devant être compris entre 60 et 140 %. L'efficacité de chaque qPCR (E, en pourcentage) a également été vérifiée à partir de la formule suivante, la pente étant celle de l'équation de la droite de la gamme étalon :

$$E = \left(\frac{-1}{pente} \right) - 1$$

La réaction de qPCR a été acceptée seulement si l'efficacité était comprise entre 90 et 110 %.

2.1.2.3.4. Sélection de souches dégradantes

Des essais de microbiologie ont été réalisés afin d'isoler des souches capables de dégrader le BaA. Il est important de connaître les microorganismes impliqués dans la dégradation des polluants car ceux-ci pourront par la suite être utilisés en bioaugmentation dans le but d'améliorer la dépollution des sols en les utilisant seuls ou en les couplant à d'autres techniques.

Une prise d'essai de 10 g de sol tamisé à 2 mm provenant du pot pollué et planté du dernier prélèvement de l'expérimentation (T12 SC P), a été introduite dans 90 mL de milieu Bushnell-Haas (BH, Annexe 4) contenant du BaA. Puisque ce milieu a la particularité de ne posséder aucune source de carbone, celle-ci sera fournie uniquement par le polluant, les microorganismes étant alors dans l'obligation de le dégrader pour croître. Le BaA, insoluble dans l'eau, a été introduit dans le milieu de culture après dissolution dans de l'acténone de façon à obtenir une concentration finale en polluant de $33,3 \text{ mg.L}^{-1}$ et une teneur en acétone de 1,5 % du volume final du milieu. Ces conditions ont préalablement été déterminées dans le but d'ajouter une quantité de BaA qui soit suffisamment importante pour exercer une pression de sélection et fournir une teneur en carbone suffisante sans qu'elle ne soit trop élevée pour ne pas présenter d'effets toxiques envers les microorganismes. Quant au

volume en acétone, celui-ci a été déterminé de façon à dissoudre suffisamment le polluant sans être trop important afin de limiter l'apport d'une source en carbone supplémentaire dans le milieu.

Un triplicat de bouillons de culture a été réalisé et ceux-ci ont été incubés à 22°C, à l'obscurité et sous agitation pendant 1 mois. Après cette période d'incubation, les milieux ont été laissés à décanter puis une dilution en cascade a été réalisée à partir de 1 mL de milieu dans de l'eau physiologique (NaCl à 8,5 g.L⁻¹) jusqu'à une dilution de 1.10⁻⁴. Deux ensemencements de 100 µL par dilution ont été effectués sur du milieu BH solide contenant du BaA afin de maintenir la pression de sélection et d'apporter une source de carbone. Le polluant a été introduit dans le milieu avant de couler les boîtes à une concentration de 33,3 mg.L⁻¹ dissous dans 1,5 % d'acétone (v/v) comme indiqué précédemment. Les boîtes ensemencées ont ensuite été incubées à 22°C à l'obscurité.

Des examens macroscopique et microscopique ainsi qu'une coloration de Gram permettant de distinguer les bactéries à Gram négatif et positif ont été effectués sur toutes les colonies microbiennes différentes qui se sont développées sur le milieu afin de permettre une première identification des souches. Onze colonies ont ainsi été testées et les résultats ont révélés qu'il s'agissait de consortia. Les colonies ont ensuite été remises en culture dans du milieu liquide BH additionné de BaA à 33,3 mg.L⁻¹ dissous dans 1,5 % d'acétone (v/v) et ont été incubées à 22°C à l'obscurité sous agitation.

Après un mois de culture, l'examen visuel des milieux a révélé un changement de couleur (brunissement) pour deux des cultures (consortia), ce qui est caractéristique de la dégradation du polluant (Figure 41 A). Aussi, un des milieux contenait un champignon qui se présentait sous forme « d'amas » sur lequel le BaA y était adsorbé (Figure 41 B). Ainsi, puisque ces microorganismes ont montré une réponse positive à la dégradation du BaA, ceux-ci ont été sélectionnés pour être testés lors de l'expérience de bioaugmentation/biostimulation.

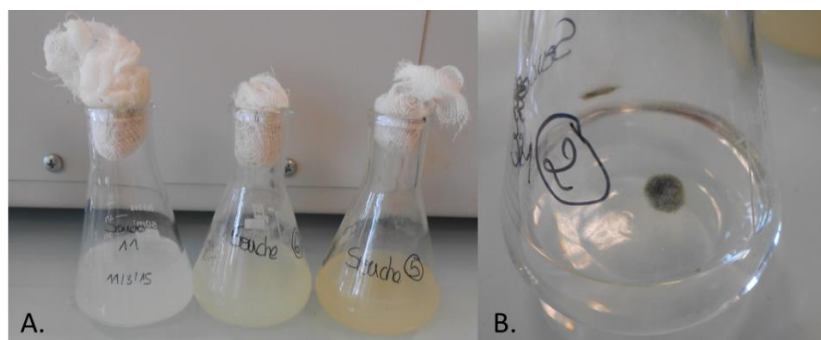


Figure 41. Photos des milieux de culture de certains microorganismes isolés de l'expérience de rhizoremédiation. En A. sont représentés à droite les deux milieux de culture des consortia dont la couleur a bruni. La photo B. représente le champignon.

2.1.2.3.5. Identification des souches dégradantes

Le champignon et les deux consortia bactériens qui ont été sélectionnés ont été identifiés par séquençage suite à l'extraction de leur ADN.

L'extraction de l'ADN du champignon a été réalisée selon une modification du protocole de Cenis (1992). Après 12 jours de culture dans 10 mL de milieu LB dilué au 1/1,25^{ème} à 22°C, à l'obscurité et sous agitation, 4 mL de milieu ont été transférés dans un tube à centrifuger de 15 mL. Après centrifugation (8700 g, 5 min), le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé avec 500 µL de tampon TE (Tris-EDTA). L'échantillon a été centrifugé (8700 g, 5 min) puis le tampon a été éliminé et 300 µL de tampon d'extraction ont été ajoutés (200 mM Tris HCl pH 8,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % w/v SDS) pour remettre le culot en suspension, ainsi que des billes de verre de différents diamètres (200 mg de billes d'un diamètre de 106 µm et 2 billes d'un diamètre de 1 mm, SIGMA-ALDRICH) après avoir transféré l'échantillon dans un tube de 1,5 mL. Un bead beating (agitation) de 2 min a été réalisé (vibration fixé, Disruptor Genie, Scientific Industries, SI-D256) puis 150 µL d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) ont été ajoutés pour précipiter les protéines. L'échantillon a été incubé 10 min à -20°C puis a été centrifugé (8700 g, 5 min). Le surnageant a ensuite été transféré dans un nouveau tube et un volume d'isopropanol a été ajouté pour précipiter l'ADN. Après une incubation de 5 min à température ambiante, l'échantillon a été centrifugé (8700 g, 5 min), puis le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé avec 300 µL d'éthanol à 70 %. Le surnageant a été éliminé après centrifugation (8700 g, 5 min) et le culot a été séché à l'air libre pendant quelques minutes puis remis en suspension dans 50 µL d'eau ultra-pure.

La qualité de l'ADN a été vérifiée sur un gel d'agarose à 1,5 % et sa quantité a été déterminée par dosage spectrophotométrique à 260 nm (BioSpec-nano, SHIMADZU). L'extrait d'ADN a ensuite été amplifié et séquencé par la société GenoScreen *via* l'utilisation du couple d'amorces NL-1/NL-4 qui cible la région D1/D2 de l'ARNr 26S des levures (Kurtzman and Robnett, 1997; Tableau 21). L'identification a été réalisée par GenoScreen qui a comparé les séquences obtenues à celles de la base de données du site NCBI grâce au programme BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tableau 21. Caractéristiques des amorces utilisées par la société GenoScreen pour identifier la souche fongique.

Communauté	Gène	Amorces	Séquence (5'→ 3')	Taille de l'amplicon (pb)
Fongique (levures)	ARNr 26S	NL-1 NL-4	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA A GGT CCG TGT TTC AAG ACG G	600

L'extraction de l'ADN des consortia a été réalisée à l'aide du kit d'extraction DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN). Après plusieurs jours de culture dans 30 mL de milieu BH supplémenté de BaA (33,3 mg.L⁻¹ dissous dans 1,5 % d'acétone (v/v)), à 22°C, à l'obscurité et sous agitation, la concentration cellulaire a été mesurée par dosage spectrophotométrique à 620 nm (UV-1800 Spectrophotometer SHIMADZU). Une quantité de 2.10⁹ cellules a été introduite dans un tube de 1,5 mL puis les cellules ont été récupérées par centrifugation (5000 g, 10 min) après élimination du surnageant. Le culot a ensuite été resuspendu dans 180 µL de tampon de lyse (20 mM Tris HCl pH 8, 2 mM sodium EDTA, 1,2 % v/v Triton X-100, 20 mg.mL⁻¹ lysozyme) et l'échantillon a été incubé à 37°C pendant 30 min. 25 µL de protéinase K ont été ajoutés ainsi que 200 µL de tampon AL puis le tube a été incubé à 56°C pendant 30 min. 200 µL d'éthanol (96-100 %) ont ensuite été ajoutés et l'échantillon a été transféré dans une colonne DNeasy Mini Spin. Après centrifugation (6000 g, 1 min), l'ADN a été adsorbé sur la membrane de la colonne et l'éluat contenant les débris cellulaires a été éliminé. 500 µL de tampon AW1 ont ensuite été introduits dans la colonne pour la laver. L'éluat a été éliminé après centrifugation (6000 g, 1 min) puis l'opération a été renouvelée avec 500 µL de tampon AW2 (20000 g, 3 min). La colonne a ensuite été placée dans un nouveau tube et 200 µL de tampon AE ont été ajoutés. Après une incubation de 1 min à température ambiante, le tube a été centrifugé (6000 g, 1 min) pour éluer l'ADN. Cette opération a été renouvelée avec 200 µL de tampon AE.

La qualité de l'ADN a été vérifiée sur un gel d'agarose à 1,5 % et l'ADN a été quantifié par dosage spectrophotométrique à 260 nm (BioSpec-nano, SHIMADZU). Les extraits d'ADN ont ensuite été analysés par la société ADNid qui a préparé les librairies, séquencé les échantillons et réalisé les analyses bioinformatiques. Les séquences obtenues ont été comparées à celles de la base de données SILVA (<https://www.arb-silva.de/>).

2.1.2.4. Analyses de la dissipation et de la biodisponibilité du BaA dans le sol

Un suivi de la teneur totale en BaA dans les sols a été réalisé au cours du temps afin d'évaluer l'impact de la plante sur la dissipation du polluant. Cependant, la diminution de sa concentration ne permet pas d'affirmer qu'il a été dégradé puisque les méthodes d'extraction ne sont en général pas assez puissantes pour récupérer le polluant adsorbé. C'est pourquoi une extraction séquentielle a été réalisée afin d'analyser les différentes formes de biodisponibilité du BaA. Ces mesures permettront également d'évaluer la quantité en BaA pouvant être potentiellement dégradée ou toxique.

2.1.2.4.1. Extraction totale du polluant à partir de sol

Le BaA a été extrait du sol (en triplicat) d'après une modification de la norme NF ISO 13877 (1999). Une prise d'essai de 5 g de sol sec et tamisé à 2 mm a été introduite dans une cartouche d'extraction en fibres de cellulose contenant 5 g de sulfate de sodium. Après avoir bouché la cartouche avec du coton cardé, celle-ci a été introduite dans un appareil de soxhlet afin d'extraire le BaA à l'aide de 80 mL d'éther de pétrole pendant 7h. Après refroidissement, l'extrait a été conservé à 4°C avant de pouvoir être concentré jusqu'à 10 mL à l'aide d'un évaporateur rotatif puis dosé.

2.1.2.4.2. Extraction séquentielle du polluant à partir de sol

L'extraction séquentielle du BaA a été réalisée en triplicat à partir d'une modification du protocole de Ma et ses collaborateurs (2010). Elle consiste à extraire le BaA du sol à partir de plusieurs solvants possédant différentes capacités d'extraction afin de représenter les différentes formes de biodisponibilité du polluant. Les 5 étapes constituant cette extraction

permettent d'extraire le BaA de sa forme la plus biodisponible à la moins biodisponible. A noter qu'il existait une dernière étape dans le protocole (extraction des polluants liés à l'humine enrichie en carbone organique) mais qu'elle n'a pas été réalisée pour des questions de sécurité en raison de l'utilisation d'acide fluorhydrique.

Une solution composée d'un mélange méthanol/eau a été utilisée pour estimer la fraction dissoute de BaA (très biodisponible). Une prise d'essai de 2 g de sol sec et tamisé a été introduite dans un tube à centrifuger de 50 mL avec 6 mL de la solution méthanol/eau (1:1 en volume). Le tube a été agité pendant 24h à 16 tours/min puis centrifugé à 2600 g pendant 20 min. Le surnageant a été récupéré puis le volume a été ajusté à 10 mL avec la même solution méthanol/eau. 3 mL de ce surnageant a ensuite été transféré dans une cartouche d'extraction C18 de 6 mL préalablement conditionnée avec 5 mL de dichlorométhane suivi de 5 mL de méthanol. Le BaA a alors été élué avec 8 mL de dichlorométhane. Avant dosage, cette solution a été séchée à l'air libre sous sorbonne pour changer le solvant en éther de pétrole (8 mL).

Du n-butanol a été utilisé pour estimer la fraction facilement désorbable du BaA. 6 mL de ce solvant a été ajouté dans le tube à centrifuger de l'étape précédente après avoir détaché le culot de sol pour le remettre en suspension. Le tube a été agité pendant 24h à 16 tours/min puis centrifugé à 2600 g pendant 20 min. Le surnageant a été récupéré, filtré, puis son volume a été ajusté à 10 mL avec du n-butanol avant d'être dosé.

Du dichlorométhane a été utilisé pour représenter la fraction de BaA associée physiquement et chimiquement au sol. 6 mL de ce solvant a été ajouté dans le tube à centrifuger et le culot de sol a été remis en suspension. Après avoir transféré le tube dans un bain à ultrasons pendant 30 min, celui a été centrifugé à 2600 g pendant 20 min. Le surnageant a été récupéré puis 6 mL de dichlorométhane ont de nouveau été ajoutés dans le tube et les étapes de bain à ultrasons et de centrifugation ont été répétées. Les surnageants ont ensuite été combinés, filtrés et le volume a été ajusté à 15 mL avant dosage.

Pour représenter le BaA lié aux acides humiques, 10 mL d'une solution de NaOH 0,1 M ont été ajoutés au culot de sol précédent. Le tube a été agité pendant 15h à 16 tours/min puis centrifugé à 2600 g pendant 20 min. Le surnageant a été récupéré, filtré et acidifié à un pH de 1 en utilisant une solution d'HCl à 6 M. Le BaA du surnageant a ensuite été extrait deux

fois avec 10 mL de dichlorométhane. Le dichlorométhane récupéré a été séché à l'air libre sous sorbonne puis changé par 10 mL d'éther de pétrole avant d'être dosé.

Afin d'estimer le BaA lié à l'humine, 10 mL de méthanol ont été introduits au culot de sol précédent. Le tube a été agité pendant 30 min à 16 tours/min puis transféré dans un bain à ultrasons pendant 1h. Après centrifugation à 2600 g pendant 20 min, le surnageant a été récupéré puis filtré. Ensuite des extractions successives du culot de sol ont été réalisées avec 10 mL d'une solution composée d'un mélange méthanol/dichlorométhane (1:1 en volume), 10 mL de dichlorométhane, puis encore 10 mL de dichlorométhane, en réalisant comme précédemment une agitation, un bain à ultrasons puis une centrifugation. La solution contenant la combinaison de tous les surnageants a ensuite été séchée à l'air libre sous sorbonne puis 10 mL d'éther de pétrole ont été ajoutés avant dosage.

2.1.2.4.3. Dosage du polluant

Les extraits de BaA ont été analysés en chromatographie liquide à haute performance (HPLC) à l'aide d'un système (WatersTM 626 Pump) équipé d'un détecteur à barrette diodes (Waters 296) et d'une colonne C18 (Interchim UP5TF-25QS). Une gamme étalon a préalablement été réalisée afin de quantifier la teneur en BaA des extraits. Un standard contenant les 16 HAP de l'US-EPA dont le BaA à une concentration de 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (SIGMA-ALDRICH) a été utilisé. Ceux-ci étant contenus dans un mélange acétonitrile/méthanol (9:1 en volume), de l'acétonitrile a été utilisé pour réaliser 6 points de gamme à des concentrations de 20 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, 15 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, 1 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, et 0,1 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Chaque point a été injecté 6 fois à partir d'un volume de 20 μL . De l'acétonitrile (solution A) et un mélange acétonitrile/eau (6:4 en volume, solution B) ont été utilisés comme solvants pour une élution par gradient à un débit de 1 mL/min (Tableau 22).

Tableau 22. Conditions du gradient utilisé pour le dosage du BaA en HPLC.

Temps	Solution A	Solution B
0 – 2 min	0 %	100 %
2 min – 20 min	Augmentation linéaire à 100 %	Diminution linéaire à 100 %
20 min – 46 min	100 %	0 %

Grâce au logiciel Empower Pro (Waters), les chromatogrammes obtenus ont été analysés à une longueur d'onde de 254 nm. L'aire du pic a été reportée pour chaque point de la gamme après avoir vérifié qu'il s'agissait bien du BaA grâce à l'observation de son spectre d'absorption (Figure 42).

Les extraits de BaA ont ensuite été injectés dans les mêmes conditions que pour la gamme étalon.

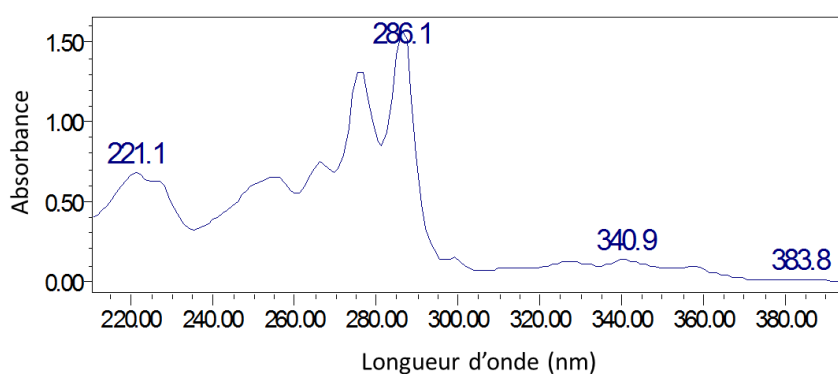


Figure 42. Spectre d'absorption du BaA.

2.1.2.5. Analyses écotoxicologiques du sol

Afin d'évaluer le caractère toxique du sol pollué au BaA et l'impact de MxG et des microorganismes sur ce paramètre, des tests d'écotoxicité ont été réalisés à partir d'une batterie d'essai (Tableau 23). Comme les effets peuvent varier selon les organismes, il est important de réaliser divers tests avec des organismes de niveau trophique différent et d'évaluer plusieurs critères d'effet. Les essais chronique et aigu ont été effectués à partir du sol alors que le test de génotoxicité a été réalisé à partir de ses lixiviats.

Tableau 23. Batterie d'essai utilisée pour les tests d'écotoxicité pour l'expérience de rhizoremédiation.

Catégorie d'essai	Niveau trophique	Fonction du sol	Espèce d'essai	Critère d'effet
Essai chronique	Producteur primaire	Fonction d'habitat	Végétale : <i>Hordeum vulgare</i>	Effets sur l'émergence et la croissance
Essai aigu	Consommateur primaire		Animale : <i>Eisenia fetida</i>	Mortalité
Essai génotoxique	Producteur primaire	Fonction de rétention	Végétale : <i>Vicia faba</i>	Apparition de micronoyaux

2.1.2.5.1. Essai aigu : *Eisenia fetida*

Le test de toxicité aiguë avec les vers de terre *Eisenia fetida* a été réalisé selon la norme NF ISO 11268-1 (2012). Il consiste à évaluer la survie de vers adultes après 14 jours d'exposition au sol.

Pour ce faire, trois réplicats ont été effectués avec 10 individus dont le clitellum²³ était bien développé et dont la masse humide était comprise entre 300 et 600 mg. Ceux-ci ont été placés dans des boîtes en plastiques contenant 500 g de sol tamisé à 2 mm et humidifié avec de l'eau distillée jusqu'à 50 % de sa capacité maximale de rétention en eau. Les boîtes ont ensuite été incubées à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ avec une photopériode jour/nuit de 16h/8h pendant 14 jours. A la fin de l'essai, la mortalité des vers a été évaluée en pourcentage.

2.1.2.5.2. Essai chronique : *Hordeum vulgare*

Des graines d'orge (*Hordeum vulgare*) ont été utilisées pour réaliser le test de toxicité chronique concernant l'effet des polluants sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs d'après une adaptation de la norme NF EN ISO 11269-2 (2013). Le test consiste à déterminer l'émergence des graines après 4 jours d'exposition au sol et à mesurer la biomasse de la moitié des pousses 14 jours après l'émergence, en les ayant préalablement séchées à 70°C pendant 16h.

²³ Région renflée du corps, uniquement présente chez les vers de terre adultes qui permet la copulation et la formation du cocon nutritif qui abritera les œufs.

Quatre réplicats ont alors été effectués avec 12 graines d'orge plantées dans des pots en plastique de 0,2 cL remplis jusqu'à 2 cm du bord (170 g) avec du sol tamisé à 2 mm. Après avoir humidifié le sol jusqu'à 60 % de sa capacité maximale de rétention en eau, les pots ont été incubés à 23°C avec une humidité relative de 70 % et une photopériode jour/huit de 16h/8h. Ceux-ci ont été arrosés tous les jours avec de l'eau distillée quand cela était nécessaire afin de maintenir un niveau d'humidité constant. Les résultats ont été exprimés en pourcentage pour l'émergence des graines et en poids sec pour la biomasse des pousses.

2.1.2.5.3. Essai génotoxique : *Vicia faba*

Le lixiviat de sol a été réalisé selon la norme XP CEN ISO/TS 21268-1 (2009). Pour ce faire, 350 g de sol sec et tamisé à 2 mm ont été transférés dans une bouteille en verre de 5 L avec de l'eau distillée de façon à avoir un ratio de 2 L.kg⁻¹. La bouteille a ensuite été agitée pendant 24h à 5 tours/min. Après cette période d'agitation, le lixiviat a été laissé à décanter pendant 2h avant utilisation. Un lixiviat a été réalisé par type de sol.

Le test de génotoxicité a ensuite été effectué avec des graines germées de fève (*Vicia faba*) d'après la norme NF T 90-327 (2004). Il consiste à évaluer l'apparition de micronoyaux (Figure 43) dans les cellules des extrémités radiculaires de *Vicia faba* suite à une exposition au lixiviat de sol. Ceux-ci, visibles dans le cytoplasme des cellules, résultent d'une cassure chromosomique ou d'un dysfonctionnement du fuseau mitotique²⁴.

²⁴ Système (constitué de microtubes) mis en place par les cellules pour permettre la migration des chromosomes lors de la mitose.



Figure 43. Micronoyaux montrés par les flèches dans les cellules des extrémités racinaires de *Vicia faba* (x 400) (NF T 90-327, 2004).

Des graines de fève ont été trempées pendant 24h dans de l'eau distillée à température ambiante afin d'éliminer leur enveloppe. Elles ont ensuite été placées dans du coton humide à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ pour qu'elles puissent germer. Après 3 jours, les extrémités des racines primaires (environ 5 mm) ont été coupées pour favoriser la croissance des racines secondaires. Pour ce faire, les racines primaires ont été immergées dans une solution de Hoagland (Annexe 5) pendant 4 jours à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ avec un renouvellement quotidien de la solution. Celles possédant des racines secondaires de 1-2 cm ont été utilisées pour le test. Six graines ont alors été exposées par type de lixiviat de sol (100 mL) pendant 37h à 22°C et à l'obscurité. De l'hydrazide maléique ($1,12 \text{ mg.L}^{-1}$) a été utilisé comme témoin positif et de la solution de Hoagland comme témoin négatif. A la fin de l'exposition, les racines ont été rincées à l'eau distillée et les 2 derniers centimètres des racines secondaires ont été coupées (environ 10 par graine) et fixées dans de la solution de Carnoy (25 % d'acide acétique glacial et 75 % d'éthanol en volume) pendant 46h à 4°C . Les extrémités racinaires ont ensuite été rincées à l'eau distillée puis transférées dans de l'éthanol à 70 % afin de les conserver avant de réaliser les observations microscopiques.

Avant observations microscopiques, les extrémités racinaires ont été rincées à l'eau distillée pendant 10 min puis hydrolysées dans une solution d'HCl 1 N à 60°C pendant 6 min, et enfin rincées une nouvelle fois à l'eau distillée. Les lames d'observation ont ensuite été réalisées en enlevant la coiffe et la région méristématique (premier millimètre) des extrémités racinaires pour ne garder que la région des cellules filles (deuxième millimètre). Enfin, l'ADN a été coloré en écrasant cette région avec une goutte d'orcéine 1 %. Lors de l'examen microscopique à un grossissement x 1000, le nombre de micronoyaux ainsi que la

proportion de cellules en cours de division mitotique ont été déterminés pour 1000 cellules par extrémité radiculaire. Deux lames ont été observées par graine et l'essai a été validé seulement si le pourcentage de cellules en cours de division mitotique était supérieur à 2 %. Les résultats ont ensuite été exprimés en nombre de micronoyaux pour 1000 cellules observées.

2.2. Expérience de bioaugmentation/biostimulation

2.2.1. Mise en place

2.2.1.1. Préparation des rhizomes de *Miscanthus x giganteus*, du sol, et plantation

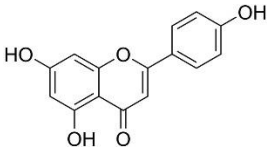
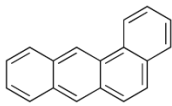
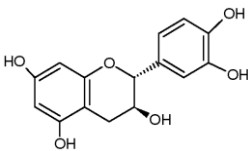
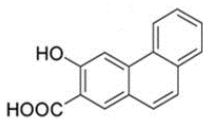
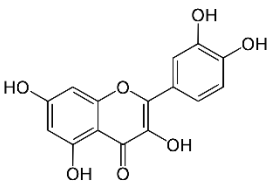
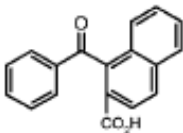
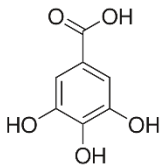
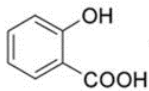
Les rhizomes de MxG et le sol pollué au BaA ont été préparés de la même manière que pour l'expérience de phyto/rhizoremédiation (paragraphes 2.1.1.1. et 2.1.1.2. respectivement).

Dans cette expérimentation, seul le sol artificiel (norme NF EN ISO 11269-2, 2013) contaminé au BaA à 50 mg.kg⁻¹ a été utilisé. Douze pots de 1,4 L ont été remplis avec 600 g de ce sol et 12 autres avec 800 g. Ceux-ci contiennent des quantités de sol différentes car ils ne vont pas subir les mêmes analyses. En effet, la quantité de 600 g étant insuffisante pour réaliser un test d'écotoxicité, celui-ci sera réalisé dans les pots de 800 g. Trois pots de chaque modalité (600 g et 800 g) ont ensuite été plantés avec MxG (Figure 44).

2.2.1.2. Préparation des exsudats racinaires

Les molécules de quercétine, d'apigénine, de catéchine et d'acide gallique, ont été choisies car elles font parties des composés majoritairement retrouvés dans les métabolites secondaires exsudés par les racines de MxG (Técher *et al.*, 2011). De plus, puisqu'elles ont une structure moléculaire similaire à celle du BaA ou de ses potentiels métabolites de dégradation (Tableau 24), elles peuvent être impliquées dans la dégradation co-métabolique du polluant.

Tableau 24. Exemples de similarité structurale entre les métabolites secondaires de MxG et le BaA ou ses métabolites de dégradation.

Métabolite secondaire de MxG	Polluant/Métabolite de dégradation
Apigénine 	Benzo(a)anthracène 
Catéchine 	Acide 3-hydroxy-2-phénanthroïque 
Quercétine 	Acide 1-benzoyl-2-naphtoïque 
Acide gallique 	Acide salicylique 

Aussi, des tests préliminaires sur des cultures bactériennes ont indiqué des réponses différentes lors de l'utilisation de ces molécules seules ou en mélanges. En effet, des précédents travaux menés par Técher (2011) en microplaques ont consisté à tester l'impact des 4 molécules sur la biomasse bactérienne et la dégradation de HAP en réalisant différents mélanges de ces molécules dans un milieu de culture minimum ou riche, en présence d'un mélange de HAP (phénanthrène, fluorène, pyrène et fluoranthène) et de 2 types de consortia bactériens ayant la capacité de croître en présence des polluants et de les dégrader. Les résultats obtenus avec le milieu riche pouvant s'apparenter à des conditions retrouvées dans le sol analysé, ont montré que quel que soit le type de consortium, la présence des HAP conduisait généralement à une stimulation de la biomasse bactérienne. Celle-ci étant associée à une augmentation de la biodégradation des polluants, il a été suggéré qu'ils étaient assimilés en tant que source de carbone par les bactéries. Le mélange composé par les 4 molécules et celui constitué d'apigénine, de quercétine et de catéchine, faisaient partis de ceux dont les effets étaient les plus marqués.

Pour cette étude, le choix s'est donc porté sur ces 2 mélanges de molécules afin de tester leur influence sur un autre HAP, le BaA, mais surtout de les étudier directement dans un sol à l'aide de techniques complémentaires.

Les molécules ont été apportées dans le sol à partir de produits synthétiques dont les quantités ont été doublées par rapport à ce qui avait été extrait des racines de MxG de façon à pouvoir détecter une réponse (Tableau 25). Les composés étant très peu solubles dans l'eau, ils ont été dissous au préalable dans un volume minimum d'acétone. Des tests préliminaires ont permis de fixer le volume d'acétone à 10 mL et celui d'eau à 40 mL pour les pots de 600 g. Par correspondance, ces volumes sont fixés à 13,3 et 53,3 mL d'acétone et d'eau, respectivement, pour les pots de 800 g. Trois pots de chaque modalité (600 g et 800 g) ont alors été arrosés avec chacun des 2 mélanges d'exsudats racinaires (Figure 44) après les avoir stérilisés par filtration à 0,2 μ m. Afin d'essayer de se rapprocher de la réalité environnementale et de représenter un système racinaire actif, cet arrosage a été effectué toutes les semaines pendant 1 mois. Puis, celui-ci a été réalisé au bout de 3 semaines et enfin au bout de 7 semaines afin de simuler un système racinaire moins actif et d'étudier une éventuelle adaptation de la microflore.

Tableau 25. Quantités de métabolites secondaires extraites à partir des racines de MxG (Técher et al., 2011).

Métabolite secondaire	Quantité extraite (mg)	Quantité utilisée (mg)
Apigénine	1,932	3,864
Catéchine	0,124	0,248
Quercétine	3,852	7,704
Acide gallique	1,422	2,844

2.2.1.3. Préparation des inocula

Un des 2 consortia bactérien ainsi que la souche fongique qui ont été sélectionnés lors de l'expérience de phyto/rhizoremédiation (paragraphe 2.1.2.3.4.), ont été utilisés en bioaugmentation dans cette expérimentation. Le choix du consortium bactérien s'est porté sur le plus efficace en termes de croissance et de dégradation suite à différentes analyses qui seront présentées par la suite (paragraphe 2.2.2.2.).

Le consortium a été cultivé dans du milieu liquide BH additionné de BaA à $33,3 \text{ mg.L}^{-1}$ dissous dans de l'acétone (1,5 % v/v). Après une culture de 18 jours à l'obscurité, à 22°C , et sous agitation, la croissance bactérienne a été quantifiée par mesure d'absorbance à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-1800 Spectrophotometer SHIMADZU). Chaque modalité (600 g et 800 g) était composée de trois pots contenant soit les mélanges d'exsudats racinaires, soit MxG ou du sol nu (sans mélange d'exsudats ni MxG). Deux pots de chaque condition (mélanges d'exsudats racinaires, MxG ou sol nu) ont été inoculés avec 10^7 bactéries par gramme de sol sec, le dernier pot servant de témoin non bioaugmenté (Figure 44). Afin d'apporter un volume d'inoculum suffisamment important pour recouvrir tout le sol, celui-ci a été fixé à 1/10 de la masse totale de sol, soit 60 mL pour les pots de 600 g et à 80 mL pour les pots de 800 g. Le consortium a alors été dilué dans de l'eau physiologique pour atteindre ce volume final.

En ce qui concerne la souche fongique, celle-ci a été cultivée dans du milieu LB dilué au $1/1,25^{\text{ème}}$ pour qu'il contienne une concentration plus faible en sources de carbone. Une pression de sélection au BaA a été réalisée en ajoutant ce HAP dans le milieu de la même façon que pour le consortium bactérien ($33,3 \text{ mg.L}^{-1}$ dissous dans 1,5 % d'acétone v/v). La culture fongique a alors été incubée pendant 10 jours à l'obscurité, à 22°C et sous agitation. Puisque le champignon se présentait sous forme « d'amas », ses spores ont été récupérées pour inoculer les sols. Ainsi, une centrifugation (3700 g, 10 min) a été réalisée à partir de 30 mL de milieu pour les pots de 600 g et de 40 mL pour les pots de 800 g, ce qui correspond à 1/20 de la masse totale du sol. Le culot contenant les spores a ensuite été remis en suspension dans un même volume d'eau physiologique après avoir éliminé le surnageant. Les culots ont été préalablement pesés afin de déterminer une masse fongique. Les pots de 600 g ont reçu en moyenne $277 \pm 11 \text{ mg}$ de champignon et ceux de 800 g, $396 \pm 20 \text{ mg}$. Les volumes de milieu à centrifuger ont été déterminés en fonction de la capacité maximale de rétention en eau du sol car un volume en eau assez conséquent était déjà apporté par le mélange d'exsudats racinaires et le consortium bactérien. En général, d'après les normes, la teneur en eau est fixée à 60-70 % de la capacité maximale de rétention en eau du sol. Etant de 32,8 % pour le sol standard, le mélange des exsudats et le consortium atteignaient déjà 56 % de cette capacité. De ce fait, les volumes fixés pour l'inoculum fongique correspondent à des volumes maximaux pouvant être ajoutés dans le sol, la teneur en eau de celui-ci

finissant par atteindre 71 % de sa capacité maximale de rétention en eau. L'inoculation du champignon a été faite pour un des pots qui contenait déjà le consortium bactérien pour chaque condition (mélanges d'exsudats racinaires, MxG ou sol nul) (Figure 44). Il restait ainsi un pot ayant seulement chacun des 2 mélanges d'exsudats, un pot contenant uniquement du sol, et un pot uniquement planté par MxG (Figure 44). Ceux-ci représentaient alors les témoins négatifs sans bioaugmentation ni biostimulation.

Tous ces pots ont été incubés pendant 105 jours dans les mêmes conditions que pour l'expérience en rhizoremédiation, c'est-à-dire dans une chambre climatique (FITOCLIMA 10000 EHHF, aralab) à 22°C avec 90 % d'humidité relative, des radiations à 350 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, et une photopériode jour/nuit de 16h/8h. Tous les 3 jours, quand cela était nécessaire, les sols ont été arrosés manuellement avec de l'eau distillée de façon à atteindre 71 % de la capacité maximale de rétention en eau du sol (par pesée).

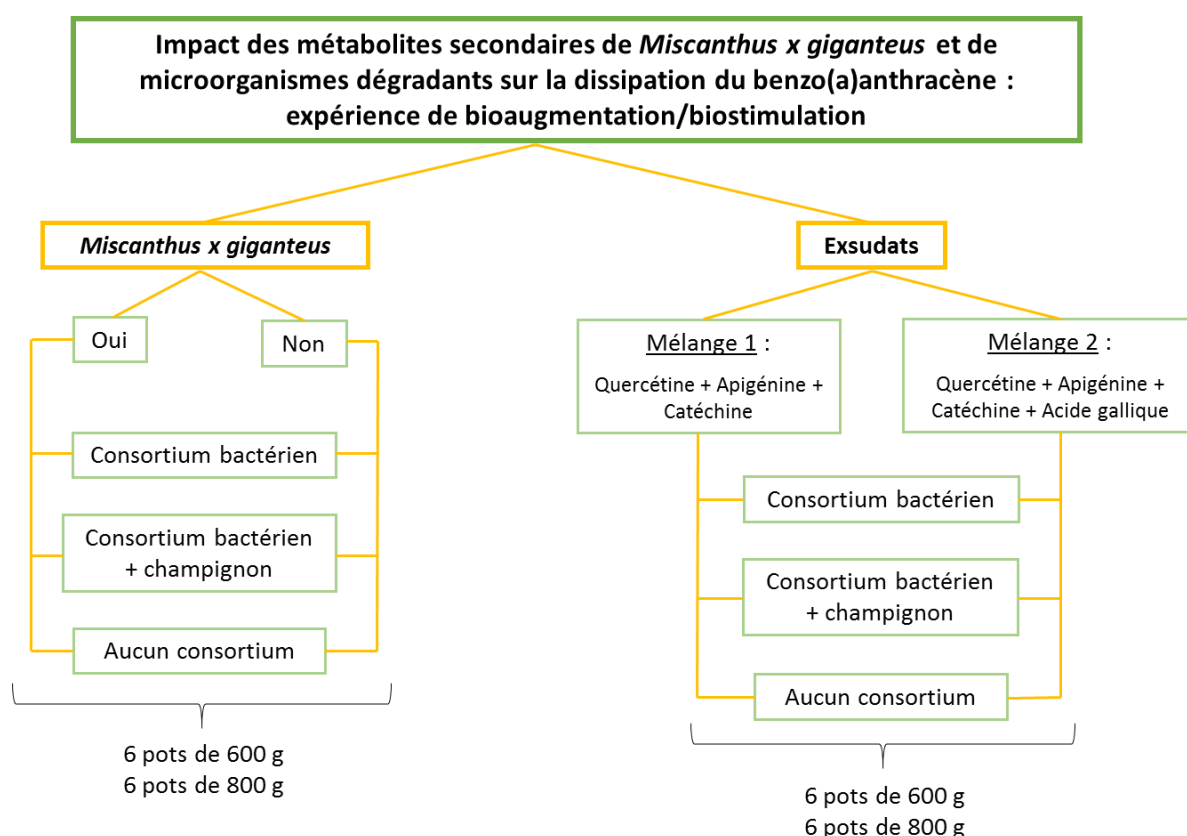


Figure 44. Différentes combinaisons testées pour l'expérience de bioaugmentation/biostimulation.

2.2.1.4. Paramètres analysés

Des prélèvements ont été effectués dans les pots de 600 g au lancement de l'expérimentation (T0), après 3 jours d'exposition (T1), puis après 15 jours (T2) et enfin après 105 jours d'exposition (T3) par carottage (Figure 45). Un ensemble d'analyses ont alors été effectuées aux différents points de prélèvement. Afin d'évaluer l'impact des différents traitements (bioaugmentation, bioaugmentation/biostimulation,...) sur la microflore du sol (bactérie et champignon), des techniques de biologie moléculaire ont été utilisées (Figure 45). La diversité totale des bactéries et des champignons a été mesurée par TTGE et la densité totale de ces microorganismes par PCR quantitative. Cette dernière technique a également permis de quantifier les bactéries à Gram positif qui possèdent un gène spécifique de dégradation des HAP. Afin d'évaluer la dissipation du BaA, un dosage total du polluant a été réalisé (Figure 45). En ce qui concerne l'influence des différentes conditions d'exposition sur le comportement du BaA dans le sol, un dosage de ses formes les plus biodisponibles a été effectué uniquement au début (T0) et à la fin de l'expérimentation (T3 ; Figure 45). A ces mêmes temps de prélèvement, une analyse de la toxicité du sol a été réalisée à l'aide du test chronique d'émergence et de biomasse avec *Hordeum vulgare* (NF EN ISO 11269-2, 2013) exclusivement dans les pots de 800 g (Figure 45). Seul ce test a été effectué car il s'est montré comme étant l'un des plus sensibles lors de l'expérience de phyto/rhizoremédiation.

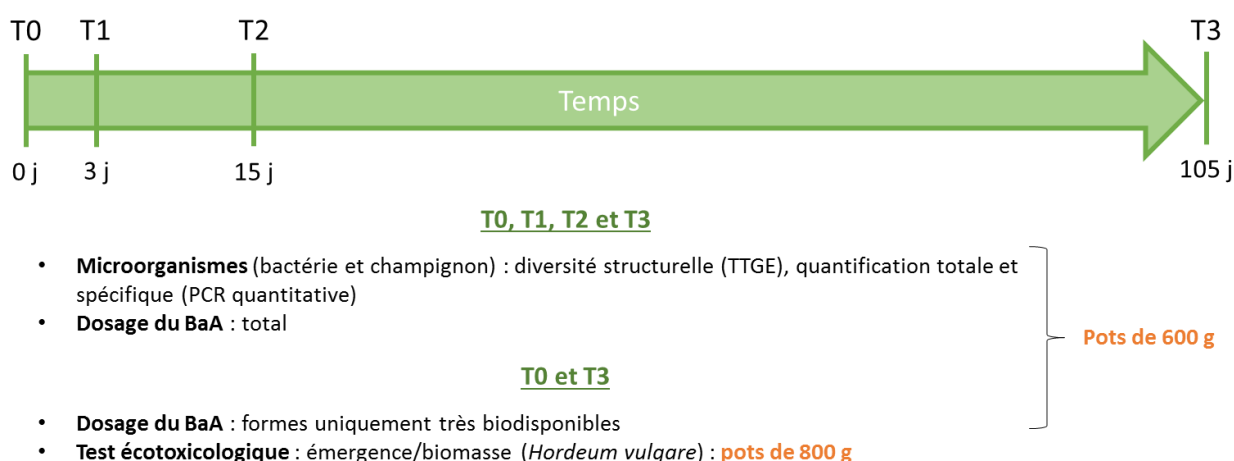


Figure 45. Temps de prélèvement et analyses effectuées pour l'expérience de bioaugmentation/biostimulation.

2.2.2. Analyses

2.2.2.1. Préparation du sol et mesure d'humidité

Après avoir prélevé le sol à chaque point de prélèvement, celui-ci a été séché à l'air libre puis tamisé à un diamètre de 2 mm dans le but de réaliser les analyses sur une terre fine et homogène. L'humidité du sol a ensuite été mesurée à l'aide de la norme NF ISO 11465 (1994) afin de reporter les résultats des analyses en poids de sol sec pour qu'ils puissent être comparables. La mesure de l'humidité a été effectuée comme pour l'expérience de phyto/rhizoremédiation (paragraphe 2.1.2.1.). Le sol a ensuite été stocké à 4°C dans un sac hermique avant de réaliser le plus rapidement possible les différentes analyses.

2.2.2.2. Sélection du consortium

Lors de l'expérience de phyto/rhizoremédiation, deux consortia bactériens capables de dégrader le BaA avaient été isolés (paragraphe 2.1.2.3.4.). Seul le plus efficace des deux en termes de croissance et de dégradation du BaA a été utilisé pour cette expérience de bioaugmentation/biostimulation. Ainsi, les consortia (consortium 1 : C1, et consortium 2 : C2) ont été mis en culture dans du milieu BH additionné de BaA (33,3 mg.L⁻¹ dissous dans de l'acétone à 1,5 % v/v) en présence ou non de chacun des deux mélanges d'exsudats racinaires (mélange 1 : E1, mélange 2 : E2 ; Figure 44) afin d'étudier la réponse des microorganismes en présence de ces composés. L'efficacité de l'association avec le champignon (CH) qui a aussi été isolé lors de l'expérience de phyto/rhizoremédiation (paragraphe 2.1.2.3.4.) a également été testée. Les différentes combinaisons qui ont été analysées sont présentées dans le tableau 26.

Tableau 26. Différentes combinaisons testées lors du choix du consortium à utiliser pour l'expérience de bioaugmentation/biostimulation.

Milieu BH seul			
C1	C2	C1+CH	C2+CH
Milieu BH + E1			
C1+E1	C2+E1	C1+CH+E1	C2+CH+E1
Milieu BH + E2			
C1+E2	C2+E2	C1+CH+E2	C2+CH+E2

Après avoir mesuré la concentration cellulaire des consortia à 620 nm grâce à un spectrophotomètre (UV-1800 Spectrophotometer SHIMADZU), 1.10^8 cellules ont été inoculées dans un volume final de 130 mL composé de milieu BH supplémenté de BaA (33,3 mg.L⁻¹ dissous dans de l'acétone à 1,5 % v/v) avec ou non les exsudats racinaires. Les mélanges d'exsudats ont été préparés à partir des quantités extraites annoncées dans le tableau 24. Ici, les quantités ne sont pas doublées comme pour le lancement de l'expérimentation car il s'agit de tests préliminaires en milieu liquide. Les mélanges ont cependant été préparés de la même manière que lors de la mise en place de l'expérimentation (paragraphe 2.2.1.2.), à savoir avec un ratio acétone/eau de 1:4 en volume. En ce qui concerne le champignon, un volume fixe de 500 µL a été ajouté dans les milieux correspondants. Tous les milieux ont ensuite été incubés pendant 5 semaines à 22°C, à l'obscurité et sous agitation.

Des prélèvements ont été effectués toutes les semaines afin de suivre l'évolution de la croissance bactérienne et de la dissipation du BaA. La croissance a été mesurée par dosage spectrophotométrique à 620 nm (UV-1800 Spectrophotometer SHIMADZU) à partir de 1 mL de culture. Afin de mesurer la concentration totale en BaA, une extraction liquide/liquide a été réalisée à partir de 5 mL de milieu de culture. Ce volume a été introduit dans un pilulier en verre et 25 mL d'eau distillée y ont été ajoutés ainsi que 6 mL de dichlorométhane de façon à obtenir un rapport eau/solvant de 1:5 en volume. L'échantillon a ensuite été agité pendant une heure à 16 tours/min avant de récupérer la phase organique (dichlorométhane). Un volume de 6 mL de dichlorométhane a de nouveau été ajouté afin de réaliser une deuxième agitation de 20 min. Après avoir récupéré le solvant, cette opération a été renouvelée. Les phases organiques ont été combinées puis le volume a été mesuré avant

dosage en chromatographie liquide à haute performance comme indiqué dans le paragraphe 2.1.2.4.3.

2.2.2.3. Analyses de la microflore du sol

L'influence du polluant ainsi que des procédés de bioaugmentation et de biostimulation sur les microorganismes du sol a été analysée au niveau de la diversité bactérienne par TTGE ainsi qu'au niveau de la densité bactérienne et fongique totale ainsi que bactérienne spécifique dégradante par PCR quantitative.

Afin de réaliser ces analyses, l'ADN microbien des sols a été extrait à l'aide de la méthode d'extraction de Petric et ses collaborateurs (2011) (méthode 1) comme indiqué dans le paragraphe 2.1.2.3.1.

L'évaluation de la diversité bactérienne a été effectuée comme énoncé dans la partie 2.1.2.3.2. par la technique de TTGE en ciblant le gène ARNr 16S à l'aide des amorces universelles 341F-GC et 534R (Muyzer *et al.*, 1993). Les gels obtenus ont été photographiés puis analysés à l'aide du logiciel PyElph (Pavel and Vasile, 2012) afin de créer une matrice binaire à partir de la présence/absence des bandes sur le gel (phylotypes). Une matrice de dissimilarité a ensuite été calculée à partir de la matrice binaire grâce à la distance de Jaccard afin d'analyser la similarité entre les échantillons par positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS).

La densité microbienne des échantillons a été analysée par qPCR d'après les protocoles du paragraphe 2.1.2.3.3. La densité bactérienne a été déterminée en ciblant le gène ARNr 16S à l'aide du couple d'amorces 341F/534R (López-Gutiérrez *et al.*, 2004), la densité fongique en quantifiant le gène ARNr 18S à l'aide des amorces Fung5F et FF390R (Lueders *et al.*, 2004) et la densité bactérienne à Gram positif dégradantes en utilisant les amorces PAH-RHD α GP F et PAH-RHD α GP R (Cébron *et al.*, 2008) qui ciblent le gène PAH-ring hydroxylating dioxygenase qui code pour une dioxygénase.

2.2.2.4. Analyses de la dissipation et de la biodisponibilité du BaA dans le sol

Dans le but d'analyser l'impact des différents procédés (bioaugmentation, biostimulation) sur la dissipation du BaA, un dosage total de sa concentration a été réalisé. Afin de vérifier si la diminution de la teneur en polluant est due à sa dégradation, une mesure de ses formes les plus biodisponibles (dissoute et facilement désorbable) a été effectuée pour quantifier la teneur en BaA potentiellement dégradable. De plus, la mesure de biodisponibilité du polluant permettra d'indiquer son éventuel impact toxique.

L'extraction totale du BaA a été effectuée comme indiqué dans le paragraphe 2.1.2.4.1. et celle de sa fraction dissoute et facilement désorbable du sol comme en 2.1.2.4.2. Les extraits de BaA ont ensuite été dosés par HPLC (paragraphe 2.1.2.4.3.).

2.2.2.5. Analyse écotoxicologique du sol

La toxicité des sols a été analysée à l'aide du test d'écotoxicité chronique basé sur la mesure de l'émergence et de la biomasse de l'orge (NF EN ISO 11269-2, 2013) afin d'évaluer l'impact des procédés de remédiation (bioaugmentation, biostimulation) sur le caractère toxique du BaA.

L'essai de toxicité a été réalisé de la même façon que pour l'expérience de phyto/rhizoremédiation (paragraphe 2.1.2.5.2.).

2.3. Analyses statistiques

Les différentes analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (3.2.3) et le risque d'erreur a été fixé à 5 %.

Avant de réaliser les analyses statistiques, la normalité des données a été évaluée à l'aide du test de Shapiro-Wilk et l'homogénéité des variances à l'aide du test de Fisher lors de la comparaison de deux moyennes et avec le test de Bartlett pour la comparaison de plus de deux moyennes.

Un test t de Student a été utilisé pour la comparaison de deux moyennes lorsque les conditions de normalité et d'homogénéité ont été vérifiées. Si seule l'homogénéité n'a pas

été vérifiée, le test t de Welch a été effectué. En revanche, si aucune n'a été respectée, le test non paramétrique de Wilcoxon a été utilisé. Lorsque les échantillons sont appariés (comparaison entre la fraction dissoute et facilement désorbable de BaA lors de l'expérience de bioaugmentation/biostimulation), ces mêmes tests ont été effectués mais en précisant l'appariement des échantillons.

Lorsque plus de deux moyennes ont été comparées, une analyse de variance à un facteur (ANOVA) a été réalisée suivie d'un test *a posteriori* de Tukey si une différence significative a été détectée. Le test non paramétrique de Kruskal Wallis a été utilisé lorsqu'au moins une des conditions d'application du test paramétrique (normalité des données, homogénéité des variances) n'a pas été respectée. Un test de Conover a ensuite été utilisé en appliquant la correction de Holm-Bonferroni si une différence significative a été obtenue.

Quand les données concernent des pourcentages (teneur totale et extraction séquentielle de l'expérience de phyto/rhizoremédiation), le test de proportion a été effectué pour la comparaison de deux moyennes et ce même test a été utilisé pour la comparaison de plus de deux moyennes en appliquant la correction de Holm-Bonferroni.

Lors de la comparaison de fréquences (mortalité de vers de terre, émergence de graines d'orge), le test exact de Fisher a été utilisé pour la comparaison de deux échantillons et en appliquant la correction de Holm-Bonferroni pour la comparaison de plus de deux échantillons.

En ce qui concerne l'analyse des matrices de dissimilarité obtenues à partir des gels TTGE, un positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS) a été réalisé afin de représenter spatialement les échantillons. Plus les échantillons sont proches plus ils sont similaires. La qualité de cette analyse a été évaluée grâce au calcul d'un indicateur nommé stress qui varie entre 0 et 1. Plus le stress est proche de 0, meilleure est la représentation. Un stress < 0,05 correspond à une excellente synthèse, un stress < 0,1 est considéré comme bon, un stress < 0,2 est correct et un stress > 0,2 est mauvais (Hervé, 2016).

RESULTATS ET DISCUSSION

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Expérience de phyto/rhizoremédiation

Dans le but d'étudier l'effet de MxG sur la dissipation du BaA directement dans sa rhizosphère, une expérience de phyto/rhizoremédiation d'une durée d'un an a été réalisée à partir d'un sol contaminé à une concentration environnementale de 50 mg.kg^{-1} (SC) et d'un sol non contaminé (SNC) pour servir de témoin négatif. Le développement de la plante a été évalué au cours du temps et des prélèvements de sol ont été effectués au début de l'expérimentation (T0), à 6 mois (T6) et 12 mois (T12) d'exposition dans les sols planté (P) et non planté (NP). La microflore du sol (diversité et densité), la teneur en polluant (totale et différentes formes biodisponibles) et sa toxicité ont alors été analysées.

3.1.1. Evaluation du développement de la plante

Le développement de MxG dans les deux types de sol (SNC et SC) a été évalué au niveau de sa croissance par mesures de la hauteur, du nombre de nœuds et du diamètre de sa tige (Figure 46), ainsi qu'au niveau de son état physiologique par un dosage de sa chlorophylle totale (Figure 47). Il est en effet nécessaire de s'assurer du bon développement de la plante pour mener à bien la remédiation des sols, notamment lorsque la durée du procédé est long comme en phyto/rhizoremédiation.

Durant toute la durée de la culture (12 mois), tous les plants se sont développés et aucune mortalité n'a été observée quel que soit le type de sol, ce qui confirme les bonnes capacités d'adaptation de MxG. De plus, la plante s'est développée de la même façon que le sol soit pollué ou non avec une augmentation progressive de la taille des tiges ainsi que du nombre de nœuds jusqu'à 8 et 6 mois de culture respectivement, puis, par une stabilisation de la croissance jusqu'à la fin de l'expérimentation (Figure 46). La hauteur des plants semble supérieure pour le sol non pollué (SNC) durant toute la période d'exposition (14 cm de différence en moyenne) et principalement lors des 4 premiers mois (jusqu'à T4 ; 24 cm de différence en moyenne) ce qui témoignerait d'un impact toxique du BaA sur la croissance végétale en début d'expérimentation. Les travaux de Técher (2011) ont également montré une taille des plants de MxG significativement plus importante en début de culture (après 60

jours) dans un sol artificiel (composé de 55 % de sol A3 LUFA, 42,5 % de sable de quartz et 2,5 % de sphaigne) comparé à un sol de friche pollué par des HAP (dont le BaA à 61 mg.kg⁻¹, une teneur proche de celle du sol utilisé lors de cette expérimentation qui est de 50 mg.kg⁻¹), puis une taille homogène (absence de différences significatives) des plantes jusqu'à la fin de l'exposition (136 jours). Le nombre de nœuds des plants de MxG semble en revanche ne présenter aucune différence entre les deux types de sol. En ce qui concerne le diamètre des tiges (Figure 46), celui-ci semble être constant durant toute la durée de l'expérimentation quel que soit le type de sol (6 mm pour le sol SNC et 5 mm pour le sol SC en moyenne). De plus, les valeurs mesurées sont proches de celles obtenues dans l'étude de Martinez Chois (2012) où le diamètre des plants de MxG exposés à un sol artificiel (composé de 55 % de sol A3 LUFA, 42,5 % de sable de quartz et 2,5 % de sphaigne) après 136 jours de culture était de 4,2 mm. Aucune différence entre les deux types de sol ne semble apparaître.

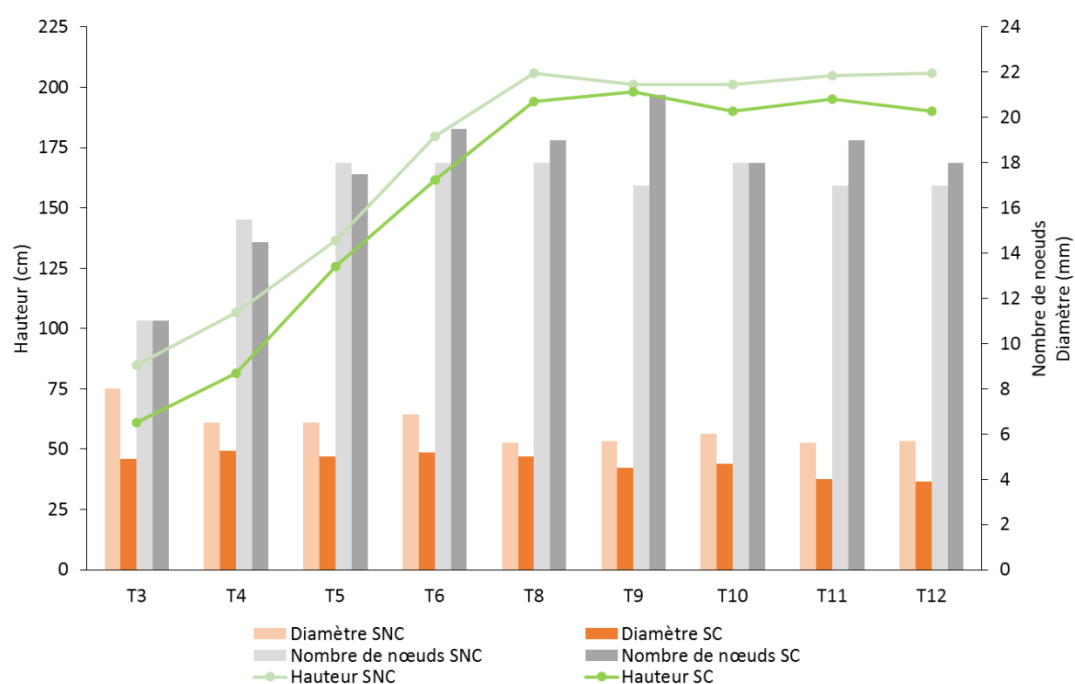


Figure 46. Evaluation de la croissance des plants de MxG au cours du temps (de T3 à T12) dans les sols non pollué (SNC) et pollué (SC) par mesures de la hauteur, du nombre de nœuds et du diamètre de la tige (moyenne, n=2 jusqu'à T6 puis n=1).

A l'inverse de la hauteur, le taux de chlorophylle des plants du sol non pollué (SNC) semble rester constant jusqu'à 8 mois d'exposition puis diminue progressivement jusqu'à la fin de l'expérimentation (Figure 47), ce qui traduit l'entrée en sénescence de la plante (Camp *et al.*, 1982; Kura-Hotta *et al.*, 1987). En revanche, la teneur totale en chlorophylle des plantes du

sol pollué (SC) semble diminuer de façon plus rapide et ce dès 3 mois de culture. Ceci pourrait correspondre à un effet toxique du BaA envers MxG. Une toxicité a également été observée dans l'étude de Técher (2011) pour des plants de MxG exposés à un sol de friche pollué aux HAP (dont le BaA à 61 mg.kg^{-1} , une teneur proche de celle du sol utilisé lors de cette expérimentation qui est de 50 mg.kg^{-1}) par un déficit en chlorophylle par rapport à des plants cultivés sur un sol artificiel (composé de 55 % de sol A3 LUFA, 42,5 % de sable de quartz et 2,5 % de sphaigne) après 136 jours d'exposition.

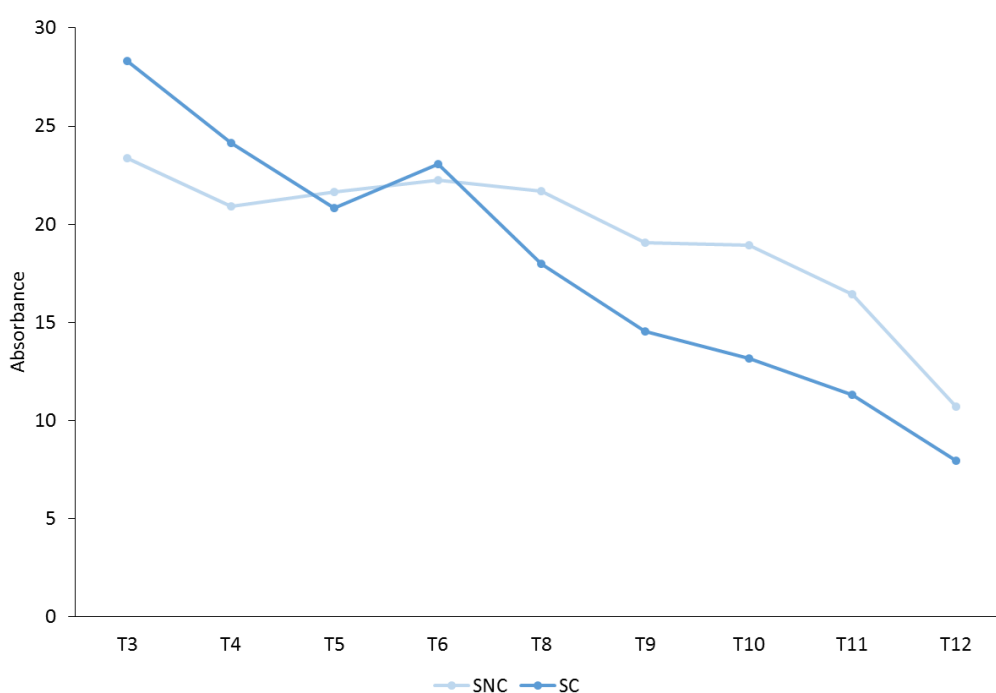


Figure 47. Evaluation de la physiologie des plants de MxG au cours du temps (de T3 à T12) dans les sols non pollué (SNC) et pollué (SC) par mesure de sa chlorophylle totale (moyenne, $n=2$ jusqu'à T6 puis $n=1$).

Bien que le BaA semble induire une toxicité envers MxG, les plants se sont adaptés aux conditions physico-chimiques des sols et se sont bien développés. Ceci confirme la tolérance de la plante à l'égard des polluants et sa capacité à croître sur différents types de sol.

3.1.2. Comparaison des deux méthodes d'extraction d'ADN

Deux méthodes d'extraction d'ADN employées au laboratoire ont été comparées afin de choisir la plus appropriée au type de sol utilisé lors de ces travaux de thèse.

Plus de 99 % des microorganismes étant non cultivables (Torsvik *et al.*, 1996), l'utilisation d'outils de biologie moléculaire est nécessaire pour évaluer divers paramètres de la microflore du sol tels que la diversité et la densité microbienne. Le résultat de ces analyses va alors dépendre de l'ADN microbien préalablement extrait du sol. L'extraction d'ADN apparaît donc comme une étape critique puisqu'elle doit être la plus représentative possible de la microflore tellurique. Ainsi, les traitements utilisés lors de la lyse cellulaire et de la purification, les deux étapes essentielles de l'extraction d'ADN, doivent être très efficaces.

Dans un premier temps, l'étape de lyse cellulaire doit permettre d'obtenir un maximum d'ADN sans le dégrader. En effet, le rendement va être affecté par la résistance de certains microorganismes à la lyse tels que les cellules « naines » (Moré *et al.*, 1994) et les bactéries à Gram positif (Zhou *et al.*, 1996), ainsi que par l'adhérence plus ou moins forte des microorganismes aux particules de sol (Priemé *et al.*, 1996). La technique employée dans les deux méthodes testées correspond à une lyse directe qui consiste à détruire les cellules directement dans le sol. Contrairement à la technique indirecte qui consiste à d'abord extraire les cellules du sol puis à les lyser, la méthode directe est plus rapide et permet d'obtenir un plus haut rendement en ADN (Roose-Amsaleg *et al.*, 2001). Lors d'une lyse indirecte, la totalité des cellules peut ne pas être récupérée. En revanche, la méthode de lyse directe a le désavantage d'extraire d'autres composés organiques du sol tels que les acides fulviques et humiques. Ceux-ci sont problématiques puisqu'ils peuvent inhiber l'amplification de la PCR par la chélation des ions Mg^{2+} , ce qui conduit à une inhibition du fonctionnement de la Taq polymérase (Tebbe and Vahjen, 1993). Aussi, ils peuvent rendre l'ADN réfractaire à la digestion complète par les endonucléases de restriction et réduire la spécificité d'hybridation de l'ADN (Tebbe and Vahjen, 1993). Ainsi, dans un second temps, l'étape de purification de l'ADN doit permettre d'éliminer un maximum de ces composés. Cependant, cette étape peut conduire à une perte des molécules d'ADN car elles peuvent être piégées dans la structure des substances humiques. Une étude de Howeler et ses collaborateurs (2003) a par exemple montré que 63 % de l'ADN extrait à partir d'un échantillon de compost étaient perdus pendant la purification bien que 97 % des acides humiques extraits aient été éliminés.

Toutes ces complications ont conduit au développement de nombreux protocoles d'extraction d'ADN dont des protocoles internes à chaque laboratoire et des kits

commerciaux afin d'optimiser la procédure d'extraction. Les kits, qui ont l'avantage d'être rapides et de réduire la variabilité entre les échantillons, ont été utilisés dans plusieurs études. Cependant, comparés aux méthodes internes, ils ne sont pas toujours plus efficaces en ce qui concerne l'efficacité de la lyse cellulaire (Carrigg *et al.*, 2007), la purification de l'ADN (Tanase *et al.*, 2015), la teneur en ADN extrait (Martin-Laurent *et al.*, 2001; Sagova-Mareckova *et al.*, 2008; Terrat *et al.*, 2012), la performance de la PCR (Sagova-Mareckova *et al.*, 2008) ou encore la représentativité de la richesse bactérienne (Tanase *et al.*, 2015; Terrat *et al.*, 2012). Les auteurs doivent alors améliorer le protocole du kit en ajoutant des étapes supplémentaires (Sagova-Mareckova *et al.*, 2008).

Les deux méthodes testées ici correspondent à des protocoles internes et utilisent les mêmes techniques de lyse cellulaire, à savoir une lyse chimique (SDS) et une lyse physique (bead-beating). En revanche, la méthode 1 diffère de la 2 par une lyse physique supplémentaire par la chaleur (bain marie à 70°C pendant 30 min). La différence principale entre les deux méthodes repose cependant sur leur étape de purification des acides humiques. Celle de la méthode 1 est réalisée lors de la lyse cellulaire en utilisant du CTAB, alors que celle de la méthode 2 est effectuée après la lyse avec du PVPP.

Puisque la récupération de l'ADN peut différer selon le type de sol (Zhou *et al.*, 1996) et notamment par la présence de contaminants, la comparaison des deux méthodes a été effectuée à la fois sur le sol non pollué (SNC) et sur le sol pollué (SC). En effet, l'extraction d'ADN d'un sol pollué est plus compliquée puisque les polluants peuvent inhiber les enzymes utilisées lors de la lyse cellulaire (ce qui n'est pas le cas ici puisqu'aucune enzyme n'est utilisée) ou réduire l'efficacité de la PCR en modifiant ou en capturant les acides nucléiques ou bien en inactivant l'ADN polymérase (Fortin *et al.*, 2004). La comparaison entre les deux protocoles a alors été réalisée au niveau de la teneur (dosage à 260 nm) et de la pureté en ADN extrait (dosage des ratios $A_{260/280}$ et $A_{260/230}$) ainsi qu'au niveau de sa qualité (dépôt sur gel d'agarose). De plus, comme les contaminants peuvent modifier la diversité et la densité microbienne du sol (Rathbone *et al.*, 1998; Verrhiest *et al.*, 2002), la comparaison a également été effectuée au niveau de la diversité bactérienne par TTGE et de la densité par qPCR en ciblant le gène ARNr 16S. La présence d'exsudats racinaires pouvant aussi modifier ces deux paramètres (Baudoin *et al.*, 2003; Marilley *et al.*, 1998), la comparaison des méthodes a également été réalisée sur le sol planté (P) et non planté (NP) aux prélèvements

T6 et T12. Ainsi, tous les échantillons de l'expérience de phyto/rhizoremédiation ont été utilisés pour la comparaison.

3.1.2.1. Teneur et pureté en ADN

Les concentrations en ADN présentées dans le tableau 27 ont été déterminées par dosage spectrophotométrique à 260 nm. Les teneurs obtenues ne diffèrent pas selon la méthode d'extraction utilisée que ce soit pour le sol non pollué (SNC) ou pollué (SC) puisqu'aucune différence significative n'est observée ($p > 0,05$). Utilisant la technique de bead-beating comme lyse physique, les concentrations en ADN des deux méthodes (de $1,20 \pm 0,22$ à $3,42 \pm 0,40 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour la méthode 1 et de $2,23 \pm 0,48$ à $11,70 \pm 1,96 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour la méthode 2) sont du même ordre de grandeur que d'autres études ayant également employé ce procédé, à savoir de $0,08$ à $35,3 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Cullen and Hirsch, 1998; Martin-Laurent *et al.*, 2001; Petric *et al.*, 2011; Schneegurt *et al.*, 2003; Smalla *et al.*, 1993). De plus, les études de Martin-Laurent et ses collaborateurs (2001) et Petric et ses collaborateurs (2011) qui ont analysé des sols avec une teneur en argile similaire au sol artificiel (22 % et 18,2 % respectivement contre 20 % pour cette étude) ont obtenu des concentrations en ADN d'environ $2 \mu\text{g.g}^{-1}$ comme pour les résultats de la méthode 1. Il est important de comparer des sols aux compositions similaires et notamment par rapport à leur teneur en argile puisque cela peut affecter l'efficacité de l'extraction (Frostegård *et al.*, 1999). En effet, avec leur grande aire de surface, les argiles vont favoriser les phénomènes d'adsorption et donc potentiellement réduire la quantité en ADN extraite.

Tableau 27. Concentrations en ADN extrait ($\mu\text{g.g}^{-1}$ sol sec, moyenne $\pm$ écart type, $n=3$) par les deux méthodes d'extraction (méthode 1 et méthode 2) à partir des sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) au cours du temps (de T0 à T12) en présence (P) ou non (NP) de la plante.

Type de sol	Prélèvement	Méthode 1	Méthode 2
SNC	T0	2,49 $\pm$ 0,27	2,73 $\pm$ 0,49
	T6 P	3,33 $\pm$ 0,27	4,40 $\pm$ 1,07
	T6 NP	2,66 $\pm$ 0,12	6,86 $\pm$ 1,86
	T12 P	3,42 $\pm$ 0,40	8,17 $\pm$ 2,38
	T12 NP	2,54 $\pm$ 0,12	10,70 $\pm$ 2,20
SC	T0	2,09 $\pm$ 0,14	2,23 $\pm$ 0,48
	T6 P	3,09 $\pm$ 0,03	11,70 $\pm$ 1,96
	T6 NP	1,20 $\pm$ 0,22	10,04 $\pm$ 3,99
	T12 P	2,94 $\pm$ 0,20	9,41 $\pm$ 3,79
	T12 NP	1,51 $\pm$ 0,14	9,67 $\pm$ 3,78

La qualité de l'ADN évaluée sur gel d'agarose, s'est montrée satisfaisante pour tous les échantillons. La pureté des extraits a ensuite été déterminée par mesure spectrophotométrique des ratios A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} (Tableau 28).

Le ratio A_{260}/A_{280} est utilisé pour évaluer la pureté de l'ADN vis-à-vis de la présence de protéines et d'ARN. Pour un extrait d'ADN de bonne pureté, il doit être situé entre 1,8 et 2 (Glaser, 1995). Pour les échantillons de la méthode 1 (SNC et SC), celui-ci est compris entre 1,48 et 2,22, indiquant que la contamination par les protéines et l'ARN est négligeable. En revanche, pour ceux de la méthode 2, les valeurs du ratio sont pour la plupart des cas bien supérieures à 2 exceptées pour l'échantillon T0 dans les deux types de sol où les valeurs sont au contraire bien inférieures ($1,25 \pm 1,74$ et $0,86 \pm 1,12$). Cette différence entre les deux méthodes est confirmée par la présence d'une différence significative pour le sol non contaminé et non planté (SNC NP) du prélèvement T12 ($p < 0.05$). Puisqu'un ratio supérieur à 2 indique une contamination par l'ARN et un ratio inférieur à 1,8 une contamination par les protéines, la méthode 2 s'avère alors moins efficace dans l'élimination des protéines et de l'ARN (selon les échantillons) par rapport à la méthode 1. Pourtant, dans le protocole de la méthode 2, une plus forte concentration en acétate de potassium et un volume plus important ont été utilisés (0,3 v/v d'acétate 5 M pour la méthode 2 contre 0,1 v/v d'acétate 3 M pour la méthode 1) pour éliminer les protéines (Smalla *et al.*, 1993). La présence de ces

contaminants proviendrait alors du plus faible temps d'incubation appliqué par rapport à la méthode 1 (5 min contre 10 min).

Le ratio A_{260}/A_{230} représente quant à lui la pureté de l'ADN vis-à-vis de la présence de composés aromatiques comme les acides humiques et les phénols. Pour un extrait d'ADN de bonne pureté, il doit être situé entre 1,8 et 2,2 (Olson and Morrow, 2012). Quelle que soit la méthode d'extraction utilisée et le type de sol, le ratio est inférieur à 1,8 pour tous les échantillons, ce qui indique la présence d'acides humiques, de phénols ou d'autres contaminants capables d'absorber à 230 nm. Les valeurs du ratio sont cependant légèrement plus élevées pour les échantillons de la méthode 2 (SNC et SC), allant de 0,47 à 0,69 contre 0,15 et 0,36 pour la méthode 1. Ceci est confirmé par des différences significatives entre les deux méthodes pour le sol non contaminé planté (SNC P) et non planté (SNC NP) au prélèvement T12 ($p < 0,05$). La méthode 1 s'avère alors moins efficace que la méthode 2 en ce qui concerne l'élimination des composés aromatiques. En effet, de nombreux réactifs tels que le CTAB ou le PVPP peuvent être ajoutés lors de l'étape de lyse cellulaire pour améliorer la pureté de l'ADN en complexant les acides humiques (Holben *et al.*, 1988; Krsek and Wellington, 1999; Lee *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1996) comme c'est le cas de la méthode 2. Cependant, plusieurs études ont montré que les contaminants n'étaient pas complètement éliminés puisque les ratios de pureté des échantillons n'étaient pas optimaux (Krsek and Wellington, 1999; Steffan *et al.*, 1988; Zhou *et al.*, 1996) et qu'une inhibition de l'activité de certaines enzymes de restriction pouvait être observée (Porteous and Armstrong, 1991). Une partie de la contamination a toutefois pu être éliminée puisque le protocole de la méthode 2 requiert une étape de purification supplémentaire par transfert de l'échantillon dans une colonne de silice. Bien que l'étude de Harry et ses collaborateurs (1999) ait montré que les contaminants persistaient avec ce type de colonne, la technique de purification de la méthode 1 qui consiste à utiliser du PVPP et de la sépharose 4B s'avère moins efficace. En effet, Arbeli et Fuentes (2007) ont montré une meilleure performance de ce procédé en utilisant d'abord la sépharose 4B puis le PVPP, contrairement au protocole de la méthode 1. De plus, lors de l'étape de lyse cellulaire, les échantillons ont été soumis à un bain marie à 70°C après le bead-beating. Or, les études de Ogram et ses collaborateurs (1987) et Selenska et Klingmüller (1991) ont révélé que l'étape de bain marie induisait une libération importante d'acides humiques. Aussi, la précipitation de l'ADN est une étape

cruciale qui peut affecter la qualité des échantillons puisque l'isopropanol qui a été utilisé pour les deux méthodes conduit à une précipitation des contaminants humiques (Arbeli and Fuentes, 2007). Les échantillons de la méthode 1 seraient alors plus contaminés car ils ont reçu un volume plus important en solvant (1 volume contre 0,3 v/v pour la méthode 2).

Ainsi, l'absence de différence de concentrations en ADN entre les deux méthodes (Tableau 27) peut être expliquée par une mauvaise purification des échantillons pouvant conduire à une surestimation des teneurs. En effet, Olson et Morrow (2012) ont montré qu'une contamination en ARN pouvait surévaluer la mesure à 260 nm et Cullen et Hirsch (1998) ont démontré que la présence de contaminants humiques pouvait surestimer la mesure jusqu'à 10 fois. De plus, certains réactifs qui sont utilisés pour précipiter ou purifier l'ADN peuvent en affecter le rendement. Par exemple, la concentration en polyéthylène glycol 800 (PEG), un réactif employé dans l'étude de Arbeli et Fuentes (2007) pour précipiter l'ADN, a significativement influencé la quantité en ADN récupérée. Une plus faible teneur a été mesurée avec 2,5 % de PEG par rapport à 5 ; 7,5 et 10 %. Bien que des concentrations en isopropanol différentes aient été utilisées selon la méthode d'extraction (1 volume pour la méthode 1 et 0,3 v/v pour la méthode 2) aucune différence de quantités en ADN n'a été observée ce qui pourrait conforter l'hypothèse de mesures biaisées.

Tableau 28. Ratios de pureté (A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230}) des extraits d'ADN (moyenne $\pm$ écart type, $n=3$) obtenus par les deux méthodes d'extraction (méthode 1 et méthode 2) à partir des sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) au cours du temps (de T0 à T12) en présence (P) ou non (NP) de la plante. Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre les deux méthodes d'extraction pour les prélèvements de chaque type de sol ($p < 0,05$).

Type de sol	Prélèvement	Méthode 1		Méthode 2	
		A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
SNC	T0	1,55 $\pm$ 0,12	0,30 $\pm$ 0,003	1,25 $\pm$ 1,74	0,47 $\pm$ 0,055
	T6 P	1,72 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,015	3,16 $\pm$ 1,05	0,69 $\pm$ 0,036
	T6 NP	2,22 $\pm$ 0,19	0,34 $\pm$ 0,049	5,08 $\pm$ 1,77	0,60 $\pm$ 0,004
	T12 P	1,78 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,025 ^a	2,79 $\pm$ 0,57	0,64 $\pm$ 0,039 ^b
	T12 NP	1,78 $\pm$ 0,05 ^a	0,33 $\pm$ 0,008 ^a	3,19 $\pm$ 0,15 ^b	0,62 $\pm$ 0,008 ^b
SC	T0	1,48 $\pm$ 0,08	0,23 $\pm$ 0,003	0,86 $\pm$ 1,12	0,50 $\pm$ 0,045
	T6 P	1,84 $\pm$ 0,07	0,30 $\pm$ 0,005	33,55 $\pm$ 22,57	0,67 $\pm$ 0,026
	T6 NP	1,93 $\pm$ 0,11	0,15 $\pm$ 0,018	43,43 $\pm$ 22,13	0,64 $\pm$ 0,025
	T12 P	1,79 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,018	4,01 $\pm$ 1,36	0,68 $\pm$ 0,009
	T12 NP	1,61 $\pm$ 0,09	0,21 $\pm$ 0,003	4,72 $\pm$ 1,49	0,68 $\pm$ 0,040

Ces résultats confirment la difficulté d'extraire de l'ADN à partir d'échantillons de sol en raison des différentes complications qui ont été obtenues avec les deux techniques d'extraction (contamination par les acides humiques, les protéines et l'ARN). Il faut toutefois souligner le fait qu'aucun protocole ne peut être totalement efficace et c'est notamment la raison pour laquelle il existe de nombreuses méthodes d'extraction d'ADN.

Malgré la pureté non optimale des extraits (présence de contaminants), les réactions de PCR (PCR-TTGE et qPCR) ont fonctionné et les analyses de diversité et de densité bactériennes ont pu être réalisées. En effet, comme cela a déjà été mentionné auparavant, la présence d'acides humiques peut inhiber la PCR. Toutefois, dans le but de remédier ce problème, le protocole de PCR peut être amélioré grâce à l'ajout d'additifs comme la protéine 32 du gène T4 (T4gp32) et/ou la BSA, ou encore par l'utilisation de Taq polymérases de haute activité. La T4gp32 se lie aux brins d'ADN dénaturés ce qui les stabilise pendant l'élongation et facilite l'action de l'ADN polymérase, conduisant alors à une réaction de PCR plus efficace (Huberman *et al.*, 1971; Kreader, 1996). Cependant, contrairement à la BSA, la T4gp32 n'empêche pas l'action des acides humiques. En effet, la BSA ajoutée en excès se lie aux acides humiques ce qui réduit l'accessibilité des ions Mg^{2+} aux contaminants (Kreader, 1996). Bien que ces additifs puissent améliorer la réaction de PCR, celle-ci ne le sera pas entièrement en présence d'un extrait d'ADN de mauvaise qualité. C'est pourquoi les échantillons peuvent au préalable être dilués pour diminuer la quantité de substances humiques tout en gardant une quantité en ADN suffisante avant la réaction de PCR.

3.1.2.2. Diversité bactérienne

La structure des communautés bactériennes a été évaluée par la réalisation d'un dendrogramme à partir de la présence/absence de phylotypes sur les gels TTGE afin d'observer la similarité entre les échantillons de la méthode 1 et de la méthode 2 d'extraction d'ADN pour chaque type de sol (SNC et SC).

L'analyse des dendrogrammes (Figure 48) montre que chaque méthode d'extraction conduit à des profils de communautés différents pour les deux types de sol. Pour le sol non contaminé (Figure 48 A), les profils de la méthode 1 sont groupés. Seul l'échantillon T12 NP de la méthode 2 est groupé avec les échantillons de la méthode 1. De plus, l'échantillon T6

NP de la méthode 2 est groupé à part des autres échantillons de cette méthode. Ceci peut s'expliquer par la très faible intensité des bandes sur le gel TTGE pour cet échantillon ce qui a conduit à une difficulté d'analyse et donc à un résultat peu sûr. Pour le sol contaminé (Figure 48 B), la différence entre les deux méthodes d'extraction est plus marquée puisque les profils de chaque méthode sont groupés sauf pour l'échantillon T0 de la méthode 1. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'à T0, les communautés bactériennes sont moins diversifiées qu'après 6 (T6) ou 12 mois (T12), durée pendant laquelle la microflore a pu évoluer sous l'influence des paramètres physico-chimiques du sol mais aussi de la plante pour le sol planté et du contaminant pour le sol pollué. Il est ainsi plus probable d'obtenir des profils similaires entre les deux méthodes en début d'expérimentation.

Même si aucune différence n'a été observée en termes de teneur en ADN (Tableau 26), l'analyse des dendrogrammes a donc montré que les profils des communautés bactériennes étaient affectés par la procédure d'extraction comme cela a déjà été reporté dans d'autres études (Carrigg *et al.*, 2007; Krsek and Wellington, 1999; Maarit Niemi *et al.*, 2001; Ning *et al.*, 2009). Celles de LaMontagne et ses collaborateurs (2002) et Ning et ses collaborateurs (2009) ont par exemple démontrées que la différence était strictement dépendante de la teneur totale en ADN alors que d'autres travaux ont montré que la quantité en ADN n'affectait significativement pas la diversité bactérienne (Luna *et al.*, 2006; Martin-Laurent *et al.*, 2001; Stach *et al.*, 2001). Dans notre étude, le protocole de TTGE a été standardisé puisque la même quantité en ADN a été utilisée pour tous les échantillons (2500 ng). Cependant, la surestimation des concentrations due à la présence des contaminants a pu biaiser les résultats. Aussi, il est possible que les extraits d'ADN soient principalement formés par des cellules facilement lysables (Stach *et al.*, 2001), s'expliquant par une différence d'efficacité pendant l'étape de lyse cellulaire. Des biais peuvent également intervenir quand les procédés de lyse sont trop vigoureux comme le bead-beating. Cela conduit à une libération de l'ADN des cellules à Gram positif mais aussi au cisaillement des molécules d'ADN libérées par les cellules à Gram négatif (Lombard *et al.*, 2011). Ainsi, un temps d'agitation plus important lors du bead-beating peut engendrer un plus haut taux de cisaillement comme cela pourrait être le cas des échantillons de la méthode 2 qui propose 6 min d'agitation contre 5 pour la méthode 1. Cependant, lors du dépôt des échantillons

d'ADN sur gel d'agarose, les bandes étaient intenses et bien définies ce qui ne correspond pas à de l'ADN dégradé.

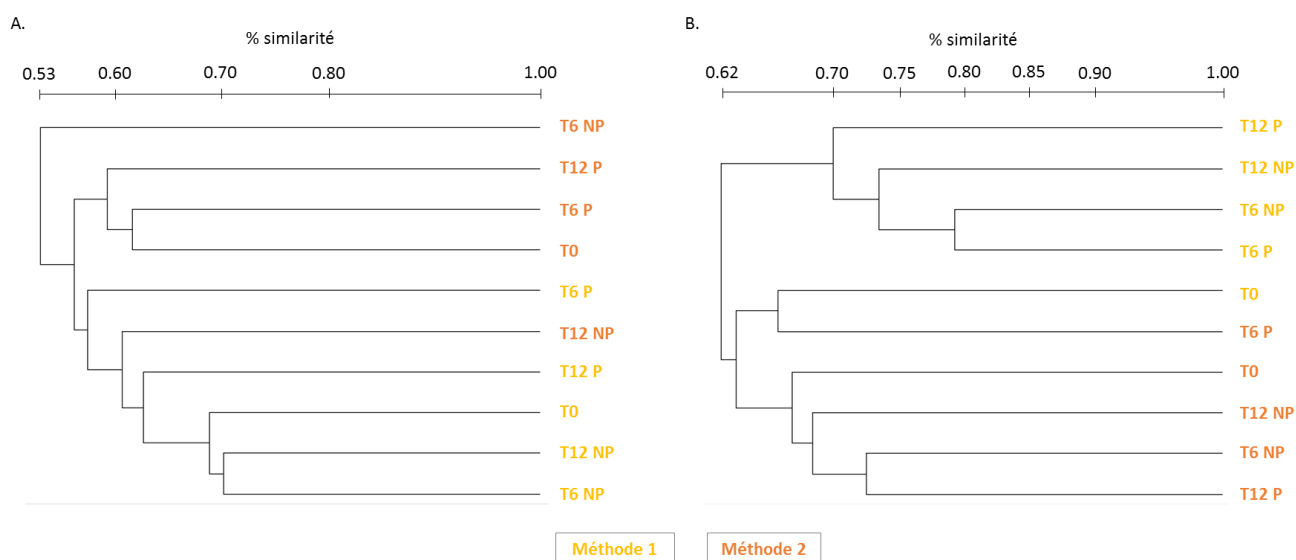


Figure 48. Dendrogrammes réalisés par la méthode UPGMA à partir de la présence/absence de phylotypes sur les gels TTGE obtenus par amplification (PCR) du gène ARNr 16S à partir d'extraits d'ADN des deux méthodes d'extraction (méthode 1 et méthode 2). La figure A présente le dendrogramme obtenu à partir des échantillons du sol non contaminé aux différents temps de prélèvement (de T0 à T12) en présence (P) ou non de plante (NP) et la figure B celui obtenu à partir des échantillons du sol contaminé.

3.1.2.3. Densité bactérienne

La densité bactérienne a été déterminée par quantification du gène ARNr 16S (Figure 49). Que ce soit pour le sol non contaminé ou contaminé, la comparaison des deux méthodes montre un nombre plus important de copie du gène ARNr 16S pour la méthode 1 par rapport à la méthode 2 ($p < 0,05$) excepté pour les échantillons du prélèvement T12 (P et NP) du sol non pollué (Figure 49 A) où aucune différence significative n'a été observée ($p > 0,05$). D'un point de vue général, la méthode d'extraction semble donc influencer la teneur en gène ARNr 16S comme cela a aussi été démontré dans l'étude de Rubin et ses collaborateurs (2014). Ainsi, les concentrations en ADN obtenues à partir de la méthode 2 semblent davantage surestimées que la méthode 1 puisque la même quantité en ADN a été utilisée pour réaliser l'analyse de qPCR (5 ng). De plus, ceci peut également s'expliquer par le fait que la technique de lyse cellulaire de la méthode 1 soit plus efficace que celle de la méthode 2 puisque l'utilisation conjointe du bain marie à 70°C et du bead-beating permet d'obtenir deux fois plus d'ADN que chaque procédé seul (Gray and Herwig, 1996; Ogram *et al.*, 1987;

Selenska and Klingmüller, 1991). Aussi, une concentration en EDTA plus importante a été utilisée dans le tampon de lyse de la méthode 1 (100 mM contre 40 mM pour la méthode 2) et il a été montré qu'une forte teneur en EDTA conduisait à une augmentation de la force d'extraction et donc à un meilleur rendement en ADN (Robe *et al.*, 2003).

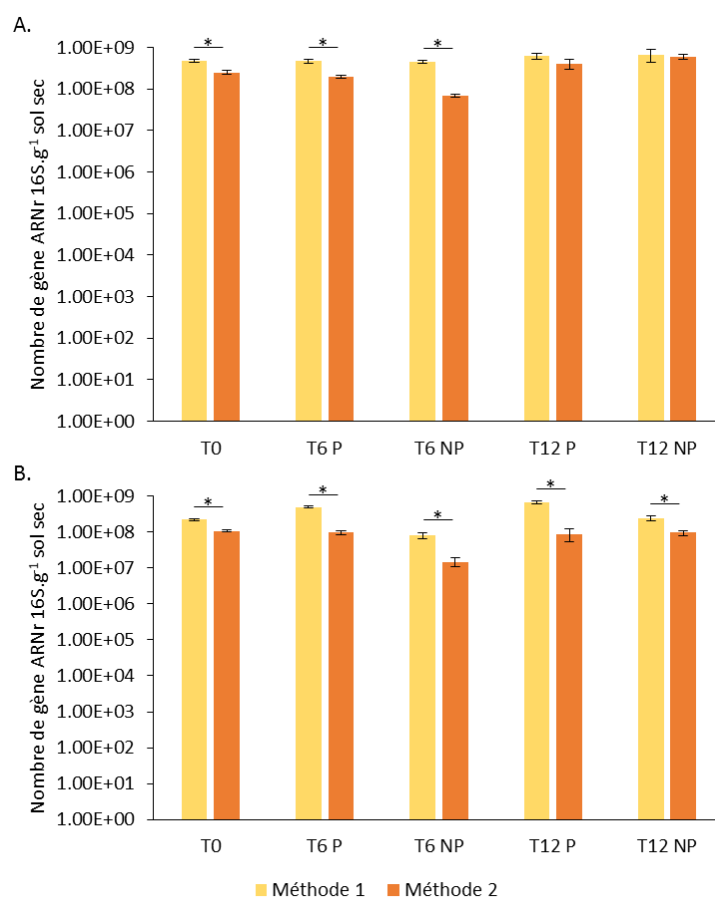


Figure 49. Nombre de copie du gène ARNr 16S (moyenne $\pm$ écart type, $n=6$) déterminé par qPCR à partir de l'ADN des deux méthodes d'extraction (méthode 1 et méthode 2) dans le sol non pollué (A) et pollué (B) au cours du temps (de T0 à T12) en présence (P) ou non de plante (NP). L'astérisque représente une différence significative entre les deux méthodes d'extraction d'ADN pour les prélèvements de chaque type de sol ($p < 0,05$).

3.1.2.4. Conclusion

Bien qu'aucune différence significative entre les teneurs en ADN des deux méthodes d'extraction n'ait été observée, les analyses de diversité et de densité bactérienne montrent une influence de la méthode d'extraction. Ainsi, la méthode 1 apparaît comme étant la plus efficace pour le sol artificiel utilisé lors de ces travaux de thèse car elle permet de recueillir plus d'informations, avec une diversité et une densité bactérienne plus

importantes que la méthode 2. La méthode 1 sera donc utilisée pour les analyses de biologie moléculaire des deux expérimentations (phyto/rhizoremédiation et bioaugmentation/biostimulation).

3.1.3. Evaluation de la microflore des sols

Les microorganismes du sol jouent un rôle primordial dans le processus de phyto/rhizoremédiation en étant impliqués dans la dégradation du contaminant et/ou dans la modification de sa biodisponibilité. Des techniques de biologie moléculaire ont alors été employées pour analyser la microflore du sol sous l'influence de la plante et du polluant. La diversité bactérienne a été évaluée par TTGE et la méthode de qPCR a été utilisée pour analyser la densité fongique et bactérienne totale ainsi que bactérienne spécifique dégradante. Des techniques de microbiologie ont également été employées dans le but d'isoler des souches microbiennes capables de dégrader le BaA. Celles-ci ont ensuite été identifiées grâce à des analyses de biologie moléculaire (PCR et séquençage).

3.1.3.1. Diversité bactérienne

La matrice de dissimilarité obtenue à partir des gels TTGE a été analysée par nMDS (paragraphe 2.3) afin de représenter spatialement la distance entre les échantillons (Figure 50). Cette analyse révèle que la diversité bactérienne des sols dépend principalement du temps avec une nette différence entre les échantillons T0 et ceux des prélèvements T6 et T12. Mis à part l'échantillon du sol non contaminé planté (SNC P) du prélèvement T6 qui possède une diversité proche de celle des sols à T0, la répartition des échantillons à T6 et T12 est similaire. Lorsque le sol est contaminé et planté (SC P), celui-ci présente une diversité proche de celle du sol non contaminé et non planté (SNC NP) alors que le sol contaminé et non planté (SC NP) possède une diversité différente de ces deux types de sol.

De ce fait, même si la diversité est plus marquée par le temps, la présence de la plante et du polluant l'affecte également.

En effet, après 6 mois d'exposition (T6), la présence de l'espèce végétale dans le sol non contaminé (SNC P) a modifié négativement sa diversité puisqu'elle se retrouve proche de celle des échantillons à T0 (diversité beaucoup moins importante à T0 par rapport à T6 et

T12 observable par le nombre de phylotypes sur les gels TTGE ; Annexe 1). L'étude de Marilley et ses collaborateurs (1998) a également montré une diversité bactérienne plus faible dans la rhizosphère de *Trifolium repens* et *Lolium perenne*, cette dernière étant une graminée pérenne de la même famille que MxG, par rapport au sol non rhizosphérique. Ceci peut s'expliquer par un phénomène de compétition entre la plante et les bactéries à l'égard des nutriments. L'étude de Gilbert et ses collaborateurs (1996) a au contraire montré une diversité plus importante dans la rhizosphère. Lorsque le sol est contaminé (SC P), cet effet de compétition n'est cependant pas observé. La présence du polluant a donc positivement influencée la diversité du sol comme c'est le cas de l'étude de Benedek et ses collaborateurs (2013) où la présence de divers hydrocarbures a conduit à une augmentation de la diversité bactérienne malgré une faible teneur en azote du sol. Le polluant a ainsi pu servir de source de carbone et d'énergie pour les bactéries, ce qui a réduit la compétition entre la plante et les microorganismes. Les résultats de l'étude de Benedek et ses collaborateurs (2013) ont également montré que la concentration en HAP était négativement corrélée à la diversité mais que cet effet n'était effectif qu'à des concentrations supérieures à 70 mg.kg⁻¹. L'absence de l'impact du BaA à T0 peut s'expliquer par le fait que la microflore n'a pas eu le temps d'évoluer en raison de la période de temps relativement courte entre la contamination du sol et l'extraction de son ADN (24h à 4°C). Cela pourrait également s'expliquer par le fait que les espèces bactériennes qui ont été impactées par le BaA présentaient une séquence d'ADN proche de celles d'autres bactéries, ce qui n'a alors pas été détectable sur le gel TTGE puisqu'un phylotype (une bande) peut correspondre à plusieurs espèces ayant une séquence d'ADN proche. Aussi, comme le gel présentait peu de bandes à T0 par rapport à T12 (Annexe 1), l'effet sur les microorganismes a pu être masqué en raison du peu d'espèces présentes.

A la fin de l'expérimentation (T12), les phénomènes de compétition observés dans le sol non contaminé et planté (SNC P) se sont réduits puisque sa diversité est devenue très similaire à celle du sol contaminé planté (SC P). Cela peut se traduire par une adaptation des bactéries au cours du temps mais également par le fait que la plante soit entrée en sénescence.

D'ailleurs, la forte similarité entre les deux types de sol souligne tout de même un impact positif de la plante par rapport au polluant. En effet, que ce soit à T6 ou T12, la diversité bactérienne du sol contaminé planté (SC P) s'apparente à celle du sol non contaminé (SNC)

alors que la diversité du sol contaminé non planté (SC NP) présente toujours une plus grande différence.

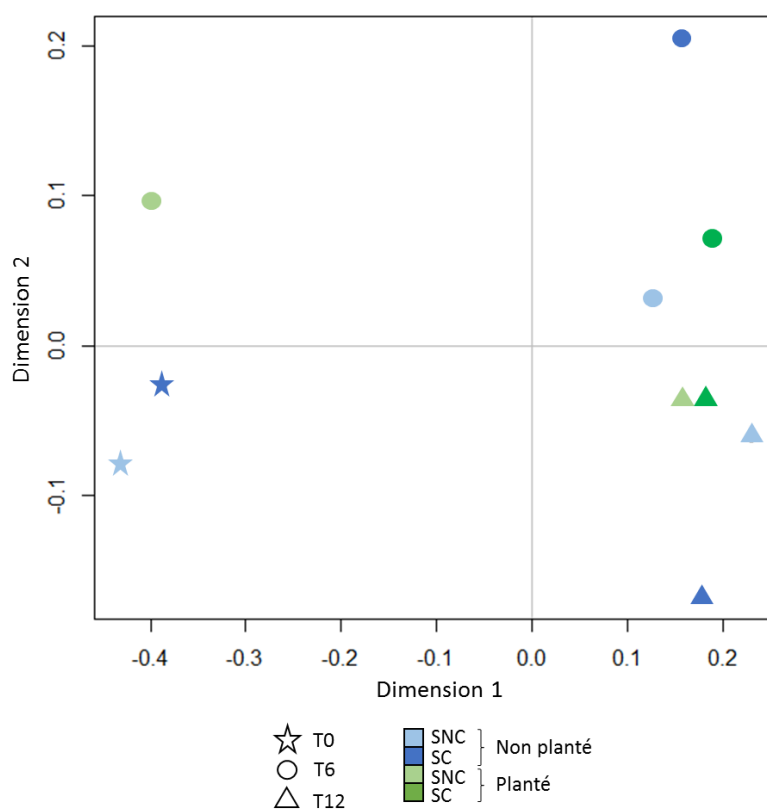


Figure 50. Analyse de nMDS réalisée à partir d'une matrice de dissimilarité générée par la présence/absence de phylotypes sur les gels TTGE obtenus par amplification (PCR) du gène ARNr 16S. Les analyses de TTGE ont été effectuées pour chaque réplicat à partir des extraits d'ADN des sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) plantés ou non, aux différents temps de prélèvement (T0, T6 et T12). Stress : 0,0731.

3.1.3.2. Densité microbienne

La densité microbienne des sols a été analysée par qPCR. Les gènes ARNr 16S et ARNr 18S ont été ciblés afin d'étudier respectivement la densité bactérienne et fongique totale. Dans le but de préciser l'impact de la plante sur les communautés dégradantes des HAP en général, le nombre de copies de gène PAH-RHD α présent chez les bactéries à Gram positif a également été évalué. Les bactéries à Gram négatif n'ont pas pu être analysées car aucune amplification n'a été obtenue.

3.1.3.2.1. Densité de gènes ARNr 16S

La figure 51 présente le nombre de copies de gène ARNr 16S présent dans les sols au cours du temps. Avant plantation (T0), un nombre significativement plus faible de gène ($p < 0,05$) est observé dans le sol contaminé (SC ; $2,21.10^8 \pm 1,12.10^7$) par rapport au sol non contaminé (SNC ; $4,71.10^8 \pm 3,81.10^7$), traduisant un impact toxique du BaA envers les bactéries. Ceci indique alors que le polluant a pu déjà impacter les communautés bactériennes lors de la période de stockage du sol à 4°C pendant 24h entre sa contamination et l'extraction de son ADN. L'étude de Verrhiest et ses collaborateurs (2002) a en effet montré l'effet négatif d'un mélange de plusieurs HAP (phénanthrène, fluoranthène et benzo(k)fluoranthène) sur la quantité bactérienne totale et viable d'un sédiment contaminé à 300 mg.kg⁻¹ dès le prélèvement T0. Après 6 mois d'exposition (T6), en absence de plante, le nombre de gènes ARNr 16S du sol contaminé (SC NP ; $8,26.10^7 \pm 1,56.10^7$) a significativement diminué ($p < 0,05$) par rapport à T0 indiquant que la toxicité du BaA est encore présente. De plus, la densité de gènes est toujours significativement inférieure ($p < 0,05$) à celle du sol non contaminé (SNC NP ; $4,55.10^8 \pm 3,97.10^7$). Ce n'est qu'après 12 mois d'exposition (T12) que la microflore bactérienne s'est adaptée puisque la quantité de gènes du sol contaminé (SC NP ; $2,37.10^8 \pm 3,61.10^7$) a significativement augmenté ($p < 0,05$) par rapport à T6 pour atteindre une densité similaire à celle de T0 ($p > 0,05$). De plus, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'est observée entre le sol contaminé (SC NP) et non contaminé (SNC NP) à T12. De ce fait, au cours du temps, les bactéries ont probablement acquis une meilleure résistance à la toxicité du BaA et/ou une amélioration de leur capacité à utiliser le composé comme substrat par métabolisme ou co-métabolisme. Aussi, l'exposition prolongée au polluant a certainement causé une sélection et une augmentation de la croissance des microorganismes résistants et notamment ceux capables de le métaboliser, les bactéries sensibles ayant été préalablement éliminées à T0 et T6.

En revanche, en présence de plante, le nombre de copies de gène ARNr 16S du sol contaminé (SC P) a significativement augmenté au cours du temps ($p < 0,05$; $4,96.10^8 \pm 3,53.10^7$ à T6 et $6,54.10^8 \pm 5,85.10^7$ à T12) pour atteindre des teneurs identiques ($p > 0,05$) à celles du sol non contaminé (SNC P) à T6 et T12, et significativement plus élevées ($p < 0,05$) que celles du sol contaminé non planté (SC NP) à T6 et T12 également. Ceci montre que la plante a impacté positivement la densité de gènes ARNr 16S en présence du polluant

puisque aucune évolution ($p > 0,05$) n'a été observée à T6 et T12 par rapport à T0 dans le sol non contaminé en présence de MxG (SNC P). Cet effet peut s'expliquer par une modification du taux et/ou de la composition en exsudats racinaires de l'espèce végétale en raison de la présence du BaA, ce qui a induit une stimulation de la microflore bactérienne. L'étude de Muratova et ses collaborateurs (2009a) a en effet montrée que le phénanthrène induisait une modification de la composition en exsudats racinaires chez le sorgho commun. De plus, Walton et ses collaborateurs (1994) ont suggéré que l'interaction entre la plante, les microorganismes et le polluant était un mécanisme de défense contre la phytotoxicité du contaminant. En présence d'un stress toxique, l'espèce végétale stimule alors les microorganismes appropriés en augmentant ou en modifiant la composition de ses exsudats racinaires. Ainsi, cette microflore spécifique va pouvoir dégrader directement le composé ou modifier sa biodisponibilité pour qu'il ne présente plus un risque pour la plante.

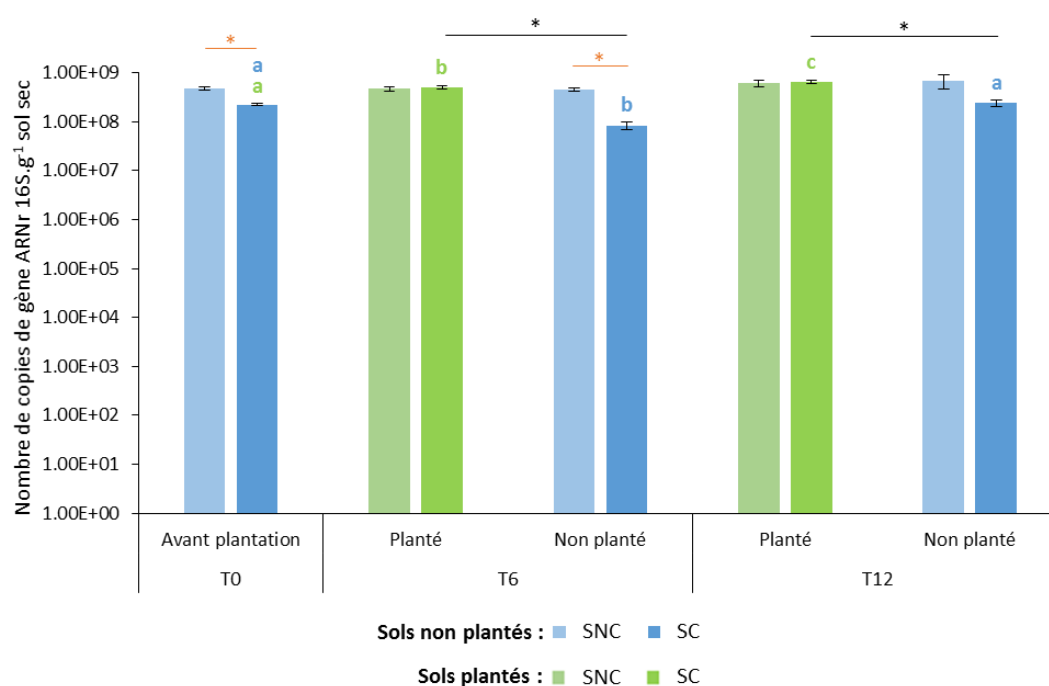


Figure 51. Nombre de gènes ARNr 16S (moyenne $\pm$ écart type, $n=6$) présents dans les sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) en présence de plante ou non au cours du temps (de T0 à T12). L'astérisque orange représente une différence significative entre le sol non contaminé et contaminé pour chaque prélèvement ($p < 0,05$). L'astérisque noir représente une différence significative entre le sol planté et non planté du sol contaminé à T6 et T12 ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T6 et T12 pour le sol contaminé planté (vertes, $p < 0,05$) ou non planté (bleues, $p < 0,05$).

3.1.3.2.2. Densité de gènes ARNr 18S

Le nombre de gènes ARNr 18S présent dans les différents types de sol au cours du temps est présenté sur la figure 52. Avant plantation (T0), une densité significativement plus faible de gènes ($p < 0,05$) est observée dans le sol contaminé (SC ; $5,85.10^5 \pm 4,89.10^4$) par rapport au sol non contaminé (SNC ; $4,02.10^6 \pm 1,05.10^6$), ce qui traduit un effet toxique du BaA envers les champignons. Le polluant a alors pu impacter les communautés fongiques lors de la période de stockage du sol à 4°C pendant 24h entre sa contamination et l'extraction de son ADN, comme c'est le cas pour les bactéries (Figure 51). L'étude de Blakely et ses collaborateurs (2002) a par exemple montré que la biomasse fongique d'un sol contaminé depuis 50 ans était négativement associée à la concentration en pyrène et en fluoranthène. Que ce soit après 6 (T6) ou 12 (T12) mois d'exposition, en absence de plante, le nombre de gènes ARNr 18S du sol contaminé (SC NP) n'a pas évolué ($p > 0,05$) par rapport à T0 ce qui indique que la microflore fongique ne s'est pas adaptée à la présence du polluant. Cela peut également s'expliquer par des conditions physico-chimiques du sol non optimales au développement des champignons puisqu'une diminution significative ($p < 0,05$) du nombre de gènes est observée dans le sol non contaminé (SNC NP) à T6 ($2,61.10^5 \pm 2,58.10^4$) et T12 ($4,23.10^5 \pm 7,32.10^4$) par rapport à T0. En effet, l'étude de Rousk et ses collaborateurs (2009) a par exemple montré qu'une augmentation du pH conduisait à une diminution de la croissance fongique. Plusieurs études ont également révélé que la structure du sol, notamment sa porosité, affectait le développement des champignons, ceux-ci ayant une croissance réduite en présence de pores de petites tailles faiblement connectés (Harris *et al.*, 2003; Pajor *et al.*, 2010; Ritz and Young, 2004). Lorsque le sol est planté, un nombre de copies de gène significativement plus important ($p < 0,05$) est observé à T6 et T12 par rapport au sol non planté que ce soit pour le sol contaminé (SC ; $3,82.10^5 \pm 7,69.10^4$ contre $5,87.10^4 \pm 1,18.10^4$ à T6 et $1,14.10^6 \pm 1,87.10^5$ contre $5,24.10^5 \pm 1,47.10^5$ à T12) ou non contaminé (SNC ; $1,18.10^6 \pm 1,36.10^5$ contre $2,61.10^5 \pm 2,58.10^4$ à T6 et $2,28.10^6 \pm 3,07.10^5$ contre $4,23.10^5 \pm 7,32.10^4$ à T12). Ceci indique que la présence de l'espèce végétale a certainement modifié la structure et/ou les paramètres physico-chimiques du sol conduisant à des conditions plus favorables au développement des champignons. En effet, elle peut modifier le pH de la rhizosphère de par son exsudation (Hinsinger *et al.*, 2003) et former des pores lors de la pénétration de ses racines dans le sol (Bodner *et al.*, 2014; Materechera *et*

al., 1994). De plus, à la fin de l'expérimentation (T12), l'abondance de gènes ARNr 18S du sol non contaminé planté (SNC P) finit par atteindre celle obtenue à T0 ($p > 0,05$) et l'abondance du sol contaminé planté (SC P) est significativement supérieure ($p < 0,05$) à celle de T0 ce qui confirme l'impact très positif de la plante. Une quantité significativement plus élevée de gènes ($p < 0,05$) est cependant observée dans le sol non contaminé planté (SNC P) par rapport au sol contaminé planté (SC P) à T6 et T12 soulignant tout de même le caractère toxique du BaA.

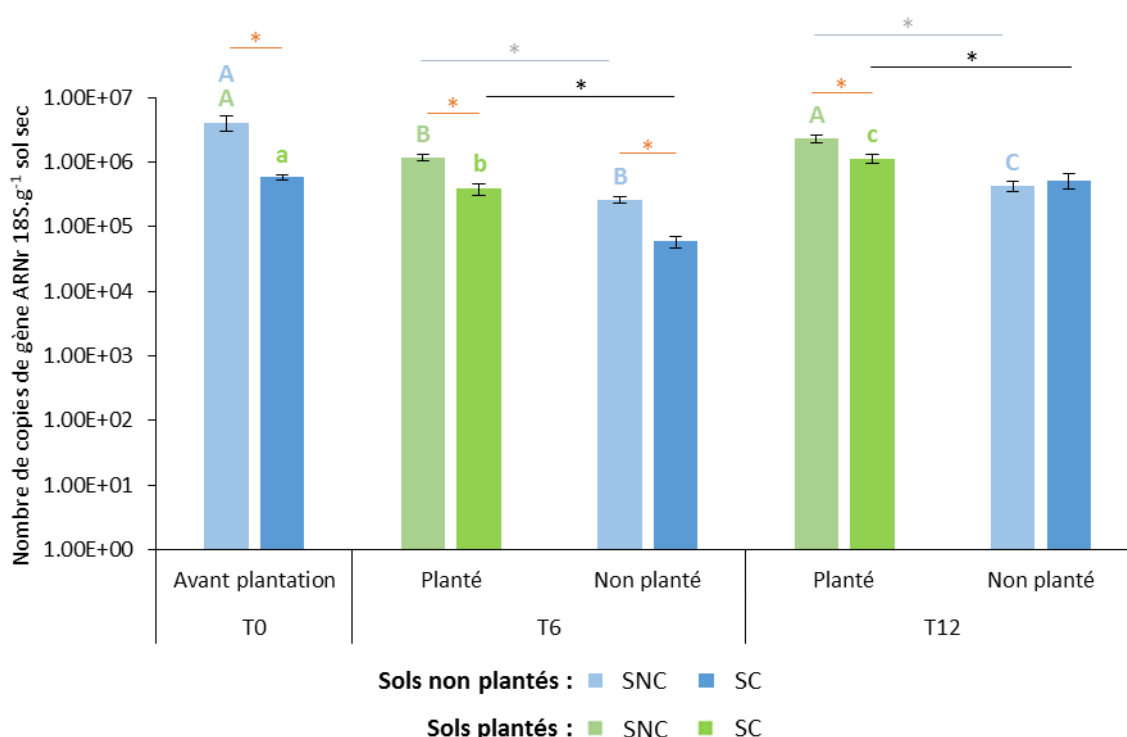


Figure 52. Nombre de gènes ARNr 18S (moyenne $\pm$ écart type, $n=6$) présents dans les sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) en présence de plante ou non au cours du temps (de T0 à T12). L'astérisque orange représente une différence significative entre le sol non contaminé et contaminé pour chaque prélèvement ($p < 0,05$). L'astérisque noir ou gris représente une différence significative entre le sol planté et non planté du sol contaminé ou non contaminé respectivement, à T6 et T12 ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T6 et T12 pour le sol contaminé planté (vertes, $p < 0,05$) ou non planté (bleues, $p < 0,05$). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre T0, T6 et T12 pour le sol non contaminé planté (vertes, $p < 0,05$) ou non planté (bleues, $p < 0,05$).

Dans le but d'estimer le nombre de champignons vis-à-vis du nombre de bactéries dans les sols, le pourcentage de gènes ARNr 18S a été calculé par rapport aux gènes ARNr 16S au cours du temps (Tableau 29). Les faibles valeurs obtenues pour tous les échantillons (de $0,06 \pm 0,01$ % à $0,86 \pm 0,22$ %) soulignent le fait que le sol artificiel ne possède pas des conditions optimales au bon développement des espèces fongiques. Aussi, le nombre de gènes ARNr

18S a toujours évolué de la même manière que le nombre de gènes ARNr 16S puisqu'aucune différence significative n'a été déterminée entre les différents types de sol quelles que soient les comparaisons effectuées. Ces résultats suggèrent que la plante ou le polluant stimulent de la même façon la croissance bactérienne et fongique.

Tableau 29. Pourcentage de gènes ARNr 18S par rapport aux gènes ARNr 16S (moyenne $\pm$ écart type, $n=6$) au cours du temps (de T0 à T12) dans les sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) plantés ou non.

Prélèvement	Condition	SNC	SC
T0	Avant plantation	0,86 $\pm$ 0,22	0,27 $\pm$ 0,03
T6	Planté	0,25 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01
	Non planté	0,06 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,02
T12	Planté	0,41 $\pm$ 0,11	0,17 $\pm$ 0,02
	Non planté	0,10 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,07

3.1.3.2.3. Densité de gènes PAH-RHD $_{\alpha}$ GP

La figure 53 présente le nombre de copies de gène PAH-RHD $_{\alpha}$ des bactéries à Gram positif obtenu dans les différents types de sol au cours du temps. Avant plantation (T0), aucune différence significative ($p > 0,05$) n'est observée entre le sol contaminé (SC ; $1,39.10^6 \pm 1,36.10^5$) et non contaminé (SNC ; $1,24.10^6 \pm 1,35.10^5$) ce qui indique l'absence d'un effet toxique direct du BaA envers ces microorganismes. De plus, la présence de ce gène montre qu'il existe initialement des bactéries potentiellement dégradantes du BaA dans le sol, celles-ci provenant certainement de la tourbe. En effet, les molécules qui composent la matière organique possèdent une similarité structurale avec les HAP. Au cours du temps (à T6 et T12), dans le sol contaminé non planté (SC NP), il n'y a pas d'évolution de la quantité de gènes puisqu'il n'y a aucune différence significative entre T0 et T6 et entre T0 et T12 ($p > 0,05$). Ceci peut s'expliquer par une faible biodisponibilité du polluant dans le sol, limitant alors son utilisation en tant que source de carbone par les microorganismes dégradants, comme cela a été suggéré dans l'étude de Cébron et ses collaborateurs (2009). En revanche, dans le sol non contaminé (SNC NP), il y a une augmentation progressive et significative ($p < 0,05$) du nombre de gènes PAH-RHD $_{\alpha}$ GP au cours du temps ($4,77.10^6 \pm 6,32.10^5$ à T6 et $8,86.10^6 \pm 6,81.10^5$ à T12) avec une densité significativement supérieure ($p < 0,05$) à celle du sol contaminé (SC NP) à T6 dont la valeur est de $1,11.10^6 \pm 2,04.10^5$ et à T12 dont la valeur

est de $2,71.10^6 \pm 4,69.10^5$. Ce résultat est en contradiction avec l'étude de Ding et ses collaborateurs (2010) où aucun gène PAH-RHD $_{\alpha}$ n'a été détecté dans un sol non contaminé témoin après 63 jours d'exposition. La présence du BaA n'est donc pas nécessaire à la croissance des bactéries à Gram positif dégradantes. Celles-ci doivent certainement utiliser d'autres composés ayant une structure analogue à celle des HAP comme ceux de la matière organique. Ainsi, puisque les microorganismes semblent croître dans le sol non contaminé non planté (SNC NP), l'absence de développement de la microflore dans le sol contaminé non planté (SC NP) à T6 et T12 ne proviendrait pas de la faible biodisponibilité du polluant mais plutôt de sa toxicité, limitant la croissance des microorganismes. Même si le gène est présent chez les bactéries, celui-ci n'est peut-être pas exprimé malgré la présence du polluant. De plus, puisque le gène PAH-RHD $_{\alpha}$ code pour des dioxygénases qui ciblent de façon générale tous les HAP, d'autres enzymes pourraient alors être impliquées dans la dégradation initiale du BaA telles que les monooxygénases, ce qui expliquerait l'absence de croissance des bactéries dans le sol contaminé non planté (SC NP), en raison d'une non dégradation du BaA. En présence de l'espèce végétale, une augmentation significative du nombre de copies du gène ($p < 0,05$) est observée au cours du temps (à T6 et T12) pour les sols contaminés (SC P ; $7,61.10^6 \pm 6,88.10^5$ à T6 et $1,08.10^7 \pm 6,54.10^5$ à T12) et non contaminés (SNC P ; $3,27.10^6 \pm 3,70.10^5$ à T6 et $7,94.10^6 \pm 5,50.10^5$ à T12) avec une quantité significativement plus importante ($p < 0,05$) dans le sol contaminé (SC P) à T6 et T12. Ces résultats indiquent que l'apport des exsudats racinaires de la plante stimule la croissance des bactéries à Gram positif dégradantes et davantage dans le sol pollué en raison du caractère phytotoxique du BaA. Ainsi, pour se défendre, MxG peut dynamiser leur croissance dans le but d'induire l'expression du gène PAH-RHD $_{\alpha}$. Les résultats de l'étude de Pagé et ses collaborateurs (2015) ont en effet montré que la plante *Salix purpurea* était capable de stimuler l'activité dégradante des microorganismes d'un sol contaminé par des hydrocarbures (dont des HAP à $91,1 \text{ mg.kg}^{-1}$). La présence de salicylate, un composé pouvant être présent dans les exsudats racinaires, pourrait par exemple en être responsable puisque des études ont montré qu'il pouvait induire l'expression de gènes codant pour des HAP dioxygénases (Chen and Aitken, 1999; Kamath *et al.*, 2004).

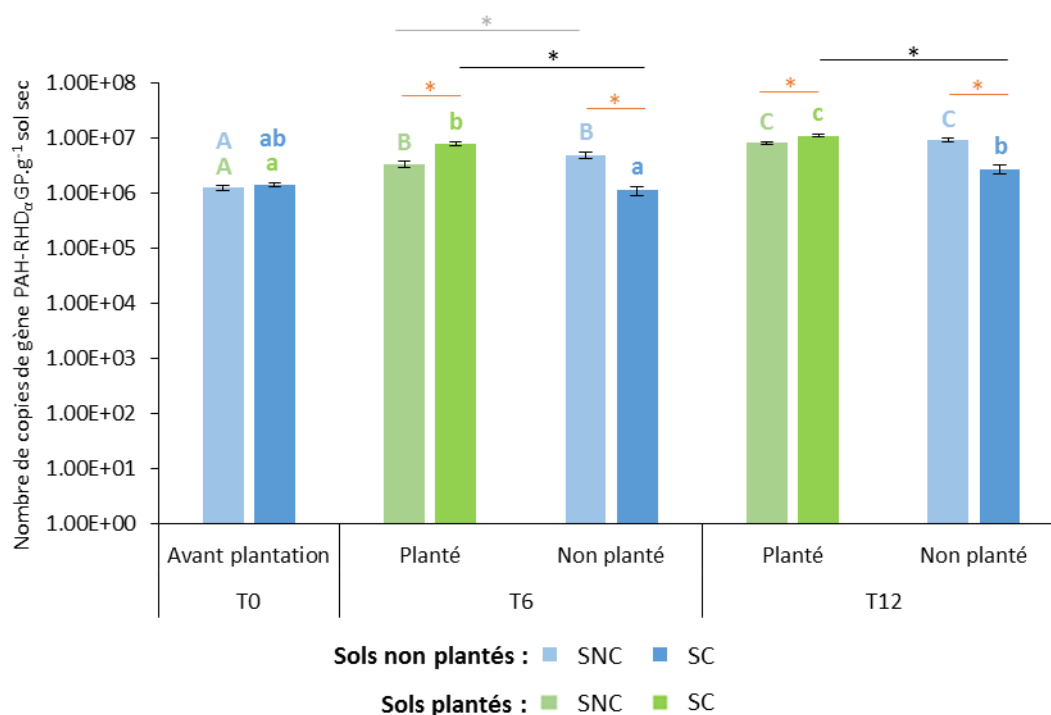


Figure 53. Nombre de gènes PAH-RHD α GP (moyenne $\pm$ écart type, $n=6$) présents dans les sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) en présence de plante ou non au cours du temps (de T0 à T12). L'astérisque orange représente une différence significative entre le sol non contaminé et contaminé pour chaque prélèvement ($p < 0,05$). L'astérisque noir ou gris représente une différence significative entre le sol planté et non planté du sol contaminé ou non contaminé respectivement, à T6 et T12 ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T6 et T12 pour le sol contaminé planté (vertes, $p < 0,05$) ou non planté (bleues, $p < 0,05$). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre T0, T6 et T12 pour le sol non contaminé planté (vertes, $p < 0,05$) ou non planté (bleues, $p < 0,05$).

Le nombre de bactéries dégradantes à Gram positif a été estimé vis-à-vis du nombre de bactéries totales dans les sols en calculant le pourcentage de gènes PAH-RHD α GP par rapport aux gènes ARNr 16S au cours du temps (Tableau 30). Même si le sol artificiel possède initialement des bactéries à Gram positif dégradantes dans sa tourbe, les faibles valeurs de pourcentage obtenues pour tous les échantillons (entre $0,27 \pm 0,03$ % et $2,29 \pm 1,11$ %) indiquent qu'elles sont tout de même minoritaires par rapport à d'autres microorganismes bactériens. Aussi, le nombre de gènes PAH-RHD α GP a toujours évolué de la même manière que le nombre de gènes ARNr 16S puisqu'aucune différence significative n'a été déterminée entre les différents types de sol quelles que soient les comparaisons effectuées. Ceci suggère que la plante ou le polluant n'exerce pas de pression sélective sur les bactéries à Gram positif dégradantes. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par l'étude de Da Silva et ses collaborateurs (2006) où l'apport d'exsudats racinaire de mûre

dans un sol contaminé ou non au phénanthrène a stimulé la croissance bactérienne totale et spécifique dégradante (nombre de copies de gène) dans des proportions similaires.

Tableau 30. Pourcentage de gènes PAH-RHD_α GP par rapport aux gènes ARNr 16S (moyenne ± écart type, n=6) au cours du temps (de T0 à T12) dans les sols non contaminé (SNC) et contaminé (SC) plantés ou non.

Prélèvement	Condition	SNC	SC
T0	Avant plantation	0,27 ± 0,03	0,63 ± 0,05
T6	Planté	0,71 ± 0,08	1,58 ± 0,22
	Non planté	1,07 ± 0,16	1,36 ± 0,14
T12	Planté	1,43 ± 0,30	1,67 ± 0,11
	Non planté	2,29 ± 1,11	1,17 ± 0,21

3.1.3.3. Identification des souches microbiennes dégradantes

Des essais de microbiologie ont été réalisés à partir d'un prélèvement de sol provenant de l'échantillon contaminé et planté (SC P) à T12 afin d'isoler des souches capables de dégrader le BaA. Deux consortia bactériens (C1 et C2) et une souche fongique ont alors été sélectionnés (paragraphe 2.1.2.3.4.) car ils ont répondu positivement à la dégradation du polluant. Des techniques de biologie moléculaire ont alors été utilisées pour extraire et séquencer leur ADN dans le but de les identifier.

En ce qui concerne le consortium 1 (C1), deux espèces bactériennes appartenant au genre *Rhodococcus* ont été identifiées ainsi qu'une souche de la classe des Alphaprotéobactéries. De nombreuses études ont démontré que diverses souches de *Rhodococcus* sp. avaient des capacités catalytiques de dégradation des HAP (Dean-Ross *et al.*, 2001; Di Gennaro *et al.*, 2001; Milić *et al.*, 2016; Rifat Zubair and Nuzhat, 2016; Song *et al.*, 2011; Walter *et al.*, 1991) dont des molécules de haut poids moléculaire tels que le pyrène (Dean-Ross *et al.*, 2001; Milić *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2011; Walter *et al.*, 1991) et le benzo(a)pyrène (Song *et al.*, 2011). La classe des Alphaprotéobactéries, quant à elle, comprenant les genres *Rhizobium* (González-Paredes *et al.*, 2013; Poonthirigpun *et al.*, 2006), *Sphingomonas* (Rentz *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2016) ou encore *Beijerinckia* (Strandberg *et al.*, 1986) qui possèdent des bactéries capables de métaboliser les HAP. Les souches *Rhizobium tropici* CIAT 899 (González-Paredes *et al.*, 2013) et *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02 (Rentz *et al.*, 2008) peuvent notamment dégrader du benzo(a)pyrène et la souche *Sphingomonas*

paucimobilis EPA 505 du pyrène, du benzo(a)anthracène, du chrysène, du benzo(a)pyrène, du benzo(b)fluoranthène et du dibenzo(ah)anthracène (Ye *et al.*, 1996), des HAP de haut poids moléculaire.

Pour le consortium 2 (C2), quatre espèces appartenant au genre *Rhodococcus* ont été identifiées dont deux similaires à celles du consortium 1. Ces deux dernières sont toutefois beaucoup moins représentées par rapport aux deux autres espèces mais également par rapport au consortium 1.

Quant à la souche fongique, il s'agit de *Fusarium oxysporum*, un champignon non ligninolytique. Ce champignon est capable de dégrader du phénanthrène (Marchand *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2009a), de l'anthracène (Jacques *et al.*, 2008; Marchand *et al.*, 2017; Ramadan *et al.*, 2012), du fluorène (Marchand *et al.*, 2017) ou encore des HAP de haut poids moléculaire comprenant du benzo(a)pyrène (Verdin *et al.*, 2004) et du pyrène (Marchand *et al.*, 2017).

Ce sont ces souches microbiennes qui seront testées lors de l'expérience de bioaugmentation/biostimulation (paragraphe 3.2.).

3.1.3.4. Conclusion

Lorsque le sol n'est pas planté, la présence du polluant modifie la structure des communautés bactériennes au cours du temps, probablement *via* la sélection de bactéries tolérantes et/ou dégradantes en raison de sa toxicité. En effet, les mesures de densités microbiennes ont révélé le caractère toxique du BaA puisque celui-ci a induit de manière générale une baisse et/ou une limitation du nombre de copies de gènes ARNr 16S, ARNr 18S et PAH-RHD $_{\alpha}$ GP au cours du temps, et ce dès le début de l'expérimentation. Par contre, lorsque le sol est planté, un effet positif de l'espèce végétale est observé en présence du contaminant puisqu'elle a conduit à une diversité bactérienne similaire à celle du sol non contaminé et a engendré une augmentation de la quantité de gènes (ARNr 16S, ARNr 18S et PAH-RHD $_{\alpha}$ GP). Ceci semble indiquer que MxG stimule la croissance microbienne des sols, et ce même en présence du BaA, et améliore la qualité et/ou la structure du milieu vis-à-vis du développement des champignons puisque le sol artificiel apparaît comme étant défavorable à leur croissance. De plus, des souches microbiennes

capables de dégrader le BaA ont pu être isolées du sol planté, en fin d'expérimentation, suggérant une éventuelle métabolisation du composé.

3.1.4. Evaluation de la dissipation du benzo(a)anthracène

Dans le but d'analyser l'impact de la plante et des microorganismes sur la dissipation du BaA dans les sols, un dosage total du polluant a été effectué au cours du temps. Puisque le dosage total ne tient pas compte des différentes formes de biodisponibilité du composé, une extraction séquentielle a également été effectuée. Lors du processus de phyto/rhizoremédiation il est en effet important de connaître la forme sous laquelle se trouve le polluant puisque cela va impacter sa dégradation, sa toxicité, mais également sa capacité à s'étendre dans le sol et à polluer les eaux.

3.1.4.1. Dosage total

Le pourcentage de BaA total récupéré pour les sols planté et non planté est présenté sur la figure 54. Le résultat obtenu à T0 ($70,8 \pm 0,7 \%$) montre que la totalité du BaA ajoutée lors de la contamination du sol n'a pas été récupérée. Ceci peut s'expliquer par une efficacité non optimale du procédé d'extraction. En effet, des études ont montré que le rendement obtenu par extraction au soxhlet à partir de sols ou de sédiments pollués aux HAP dépendait du solvant utilisé (Guerin, 1999; Hollender *et al.*, 2003; Itoh *et al.*, 2008) mais également de la durée du procédé, une augmentation du temps d'extraction permettant d'obtenir un meilleur rendement (Guerin, 1999). Cependant, dans l'étude de Itoh et ses collaborateurs (2008), ce dernier paramètre n'a pas impacté l'efficacité puisque celle-ci s'est révélée similaire avec 4, 6, 16 ou 24 h d'extraction. Le résultat obtenu à T0 pourrait alors plutôt s'expliquer par le solvant qui a été utilisé (éther de pétrole). Aussi, une autre hypothèse serait que le BaA se soit fortement adsorbé sur les particules de sol dont la matière organique lors de la période de stockage de 5 mois à -20°C entre la contamination du sol et l'extraction du polluant.

Six mois après le début de l'expérimentation (T6), bien qu'une différence significative ($p < 0,05$) apparaisse entre le sol planté ($60 \pm 1,8 \%$) et non planté ($79,4 \pm 4,1 \%$), le pourcentage de BaA récupéré dans les deux sols n'est pas significativement différent de T0 ($p > 0,05$). Il ne

semble donc pas y avoir un effet de la plante sur la dissipation du polluant bien qu'une augmentation du nombre de copies des gènes ARNr 16S et PAH-RHD α GP ait été observée dans le sol planté (Figures 51 et 53). Ce résultat est similaire à celui de l'étude de Thomas et Cébron (2016) où un ralentissement de la dégradation du phénanthrène a été observé en présence de ray-grass alors qu'il y a eu une augmentation du nombre de gènes PAH-RHD α GP. Ceci peut s'expliquer par le fait que les microorganismes dégradent préférentiellement les composés des exsudats racinaires plutôt que le BaA puisque ceux-ci sont plus faciles à métaboliser et plus biodisponibles. Les carbohydrates, les acides aminés et les acides organiques sont par exemple considérés comme les principales sources de nutriments et d'énergie facilement dégradables dans la rhizosphère (van Hees *et al.*, 2005). De plus, ces composés sont hautement solubles ce qui leur confère une forte mobilité dans le sol et une assimilation rapide par les cellules microbiennes. En ce qui concerne le sol non planté, l'absence de dissipation du polluant peut s'expliquer par la toxicité du BaA envers les microorganismes puisqu'une diminution du nombre de gènes ARNr 16S (Figure 51) a été observée à T6 par rapport à T0 ainsi qu'une non évolution de la quantité de gènes ARNr 18S (Figure 52) et PAH-RHD α GP (Figure 53).

En revanche, après 12 mois d'exposition, une diminution significative du BaA est observée dans les deux types de sol ($p < 0,05$). Celle-ci se montre plus importante dans le sol planté avec $12,0 \pm 1,6$ % de BaA récupéré contre $51,7 \pm 2,8$ % pour le sol non planté, ce qui fait une différence d'environ 40 % entre les deux sols. La dissipation du polluant peut provenir de la formation de résidus non extractibles en raison du processus de vieillissement de la contamination (Hatzinger and Alexander, 1997; Ling *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2012a; Northcott and Jones, 2001). Dans ce cas, la plus faible teneur en BaA obtenue dans le sol planté par rapport au sol non planté pourrait s'expliquer par une quantité plus importante en matière organique due à la présence des exsudats racinaires de MxG (Angers and Caron, 1998). De plus, ces derniers ont pu diminuer le pH du sol rhizosphérique, conduisant à une adsorption du HAP sur les particules de sol (Hinsinger *et al.*, 2003; Laor *et al.*, 1998; Ping *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2001). La croissance des racines a également pu induire une compaction du sol (Bruand *et al.*, 1996) ce qui a augmenté la séquestration du contaminant. Toutefois, la dissipation du BaA peut aussi provenir de la dégradation du composé. Cette hypothèse peut s'expliquer par une plus grande quantité de gènes ARNr 16S, ARNr 18S et PAH-RHD α GP par

rapport à T0 et T6 dans le sol planté (Figures 51, 52 et 53) et par un nombre plus important de gènes ARNr 16S et PAH-RHD α GP par rapport à T6 dans le sol non planté (Figures 51 et 53). Une densité potentiellement plus importante de ces microorganismes aurait alors permis la dégradation du BaA. Si tel est le cas, le résultat obtenu pour le sol non planté révèle que le sol artificiel possède des capacités dégradantes grâce certainement aux microorganismes provenant de sa tourbe. En effet, dans l'étude de Hofman et ses collaborateurs (2014), une dissipation du phénanthrène a été observée dans un même sol artificiel alors qu'aucune stimulation n'ait été ajoutée. La microflore semble alors s'être adaptée au cours du temps à la présence du BaA et a fini par le dégrader. L'exposition prolongée au polluant a certainement conduit à une sélection des microorganismes les plus résistants avec une augmentation de leur croissance et donc de la dégradation du BaA. Les microorganismes qui métabolisent la matière organique seraient probablement impliqués dans la dégradation du polluant puisqu'elle est composée de molécules complexes ayant une similarité de structure avec les HAP. Pour le sol planté, la présence d'une microflore plus importante qu'à T6 (densité de gènes plus importante) aurait probablement induit un phénomène de compétition entre les microorganismes pour les nutriments provenant de la plante (exsudats racinaires) ce qui les a conduits à dégrader le polluant. La plus faible teneur en BaA mesurée à T12 dans ce sol par rapport au sol non planté indique que MxG influence fortement sa dégradation. Ce résultat peut s'expliquer par la plus forte abondance en gènes ARNr 16S, ARNr 18S et PAH-RHD α GP dans le sol planté comparé au sol non planté (Figures 51, 52 et 53). MxG aurait alors stimulé les microorganismes dégradants ce qui a augmenté la métabolisation du BaA. Ceux-ci peuvent notamment correspondre au genre bactérien *Rhodococcus*, à la classe des Alphaprotéobactéries ou encore au champignon *Fusarium oxysporum* (paragraphe 3.1.3.3.).

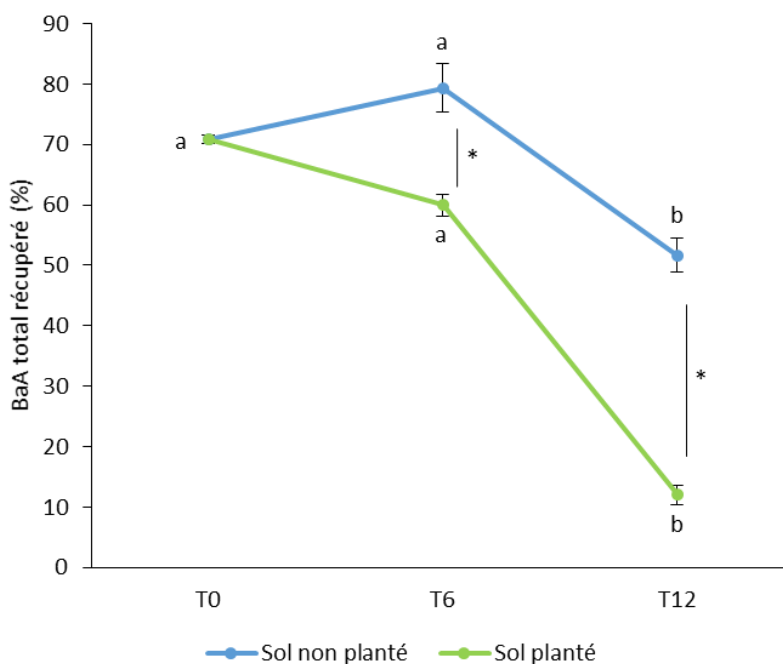


Figure 54. Pourcentage de BaA total récupéré (moyenne $\pm$ écart type, $n=3$) au cours du temps (de T0 à T12) dans les sols planté et non planté. Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre les différents prélèvements pour chaque type de sol ($p < 0,05$). L'astérisque représente une différence significative entre les sols planté et non planté à T6 et T12 ($p < 0,05$).

3.1.4.2. Dosage des différentes formes de biodisponibilité

Une extraction séquentielle en 5 étapes a été effectuée afin d'évaluer les différentes formes de biodisponibilité du polluant (Figure 55). La somme des fractions qui permet de déterminer le pourcentage total de BaA récupéré montre des résultats similaires à ceux du dosage total (Figure 50), à savoir une diminution du polluant dans les deux types de sol après 12 mois d'exposition ($p < 0,05$) et de façon plus importante dans le sol planté avec une différence d'environ 40 % par rapport au sol non planté. En revanche, à T0, le rendement de la méthode d'extraction séquentielle est significativement supérieur à celui de la méthode d'extraction totale avec 86,2 % de BaA récupéré contre 70,8 % ($p < 0,05$).

Quel que soit le prélèvement, le composé a été extrait dans toutes les fractions extractibles du sol (dissoute, facilement désorbable et associée physiquement/chimiquement) avec des concentrations plus importantes dans les fractions dissoute et facilement désorbable. En revanche, en ce qui concerne la partie non extractible du sol (acides humiques et humine), aucune molécule de BaA n'a été détectée comme étant liée aux acides humiques, et très peu ont été dosées dans la fraction correspondant à l'humine. Ceci signifie qu'aucune molécule

de BaA n'a été fixée sur cette partie du sol en raison probablement de sa taille moléculaire. En effet, dans l'étude de He et ses collaborateurs (2008), les HAP non extractibles d'un sol sableux pollué depuis plusieurs années étaient majoritairement représentés par des composés à 2 et 3 cycles. L'une des hypothèses des auteurs fut l'exclusion de taille dans les micropores de la matière organique des HAP à 5 et 6 cycles en raison de leur grande taille moléculaire. L'absence du BaA dans la partie non extractible du sol pourrait également s'expliquer par une adsorption si forte du polluant que les solutions d'extraction n'ont pas pu l'extraire. Une étape supplémentaire, réalisée à la suite de l'extraction des polluants liés à l'humine, pourrait être effectuée afin d'extraire les HAP fixés à l'humine enrichie en carbone organique comme cela est préconisé dans le protocole de l'extraction séquentielle (paragraphe 2.1.2.4.2.). De ce fait, du BaA se trouve peut être dans cette fraction.

Avant plantation (T0), les proportions en BaA facilement désorbable et associé physiquement/chimiquement sont similaires ($38,8 \pm 3,1$ % et $40,2 \pm 4,6$ % respectivement, $p > 0,05$) ainsi que celles correspondant à la fraction dissoute et à l'humine ($5,4 \pm 0,6$ % et $1,7 \pm 0,1$ % respectivement, $p > 0,05$). Ainsi, la moitié du BaA se trouve déjà sous une forme peu biodisponible.

Après 6 mois d'exposition (T6), les résultats obtenus dans le sol planté (T6 P, Figure 55 A) et non planté (T6 NP, Figure 55 B) sont identiques, ce qui traduit que l'espèce végétale n'a pas influencée la biodisponibilité du BaA. Comparé à T0, une concentration significativement plus élevée en BaA a été obtenue dans la fraction facilement désorbable ($53,6 \pm 0,7$ % pour T6 P et $61,9 \pm 3,0$ % pour T6 NP, $p < 0,05$) alors qu'une teneur significativement plus faible a été détectée dans la fraction associée physiquement/chimiquement ($26,7 \pm 0,4$ % pour T6 P et $21,2 \pm 1,7$ % pour T6 NP, $p < 0,05$). Cela signifie qu'une partie du BaA est plus biodisponible pour les microorganismes et la plante, pouvant alors être dégradée et/ou présenter une toxicité. En ce qui concerne le BaA dissous et lié à l'humine, aucune différence significative n'est observée par rapport à T0 ($p > 0,05$). Au sein des échantillons T6 P (Figure 51 A) et T6 NP (Figure 51 B), le pourcentage de polluant facilement désorbable est significativement supérieur à celui associé physiquement/chimiquement ($p < 0,05$). Ainsi, une partie du BaA associé physiquement/chimiquement au sol semble s'être retrouvée dans la fraction facilement désorbable, traduisant une augmentation de sa biodisponibilité et donc de sa plus forte probabilité à être dégradée par les microorganismes et la plante, mais

aussi à devenir toxique envers ces organismes. Ces résultats sont contraires à ceux obtenus par MacLeod et Semple (2000, 2003) où l'extractibilité du pyrène, un HAP moins lourd et moins hydrophobe que le BaA, a diminué dans la fraction désorbable et a augmenté dans la fraction associée physiquement/chimiquement après 6 mois d'exposition. Les caractéristiques physico-chimiques des deux sols étudiés étaient toutefois différentes de celles du sol standard artificiel (28 et 25 % de sable, 29 et 31 % d'argile contre 69 % de sable et 20 % d'argile pour le sol standard). Les résultats obtenus restent tout de même plutôt inattendus et notamment dans le sol non planté (T6 NP) en raison du processus de vieillissement de la contamination. Plusieurs études ont en effet révélé que les HAP devenaient moins biodisponibles avec le temps (Hatzinger and Alexander, 1997; Ling *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2012a; Northcott and Jones, 2001). Toutefois, Joner et ses collaborateurs (2004) ont montré que les HAP d'un sol contaminé depuis plusieurs années (> 50 ans), dont des HAP de haut poids moléculaire, étaient fortement biodisponibles. Les caractéristiques physico-chimiques du sol étaient cependant différentes de celles du sol standard (34 % de sable et 9 % d'argile contre 69 % de sable et 20 % d'argile pour le sol standard). Puisque MxG n'est pas impliquée dans l'augmentation de la biodisponibilité du BaA, d'autres paramètres ont pu affecter la mobilité du polluant tels que les caractéristiques physico-chimiques du sol ou les microorganismes. Par exemple, la présence de matière organique dissoute dans la solution du sol améliore la désorption des HAP (Kögel-Knabner and Totsche, 1998) et la présence de biosurfactants produits par les microorganismes comme l'alasan ou le rhamnolipide augmentent leur solubilité aqueuse (Barkay *et al.*, 1999; Gu and Chang, 2001; Zhang *et al.*, 1997). Bien que le BaA soit plus biodisponible, l'absence de sa dissipation confirme l'hypothèse selon laquelle les microorganismes dégradent préférentiellement les composés des exsudats racinaires dans le sol planté et souligne son caractère toxique dans le sol non planté.

A la fin de l'expérimentation (T12), les résultats diffèrent selon la présence de MxG. Dans le sol planté (T12 P, Figure 55 A), la proportion en BaA associée physiquement/chimiquement continue de diminuer pour atteindre une valeur de $9,2 \pm 0,7$ %. Cette proportion est significativement plus faible que celle obtenue à T0 et T6 P ($p < 0,05$). Aussi, une teneur significativement moins importante en BaA est observée dans la fraction facilement désorbable à T12 P ($19,4 \pm 0,1$ %) par rapport à T0 et T6 P ($p < 0,05$). Ces diminutions sont

dues à la faible proportion de BaA total obtenue par la somme des fractions. Aucune teneur en polluant n'a été détectée dans la fraction correspondant à l'humine, et la concentration en BaA dissous mesurée n'est pas significativement différente de celles obtenues à T0 et T6 P ($p > 0,05$). Ces résultats suggèrent que la biodisponibilité du HAP a encore augmenté puisqu'une partie de la fraction associée physiquement/chimiquement du polluant est certainement devenue désorbable. Ainsi, l'absence d'augmentation de la teneur en BaA dans la fraction facilement désorbable semble indiquer que la dégradation du polluant provienne de celle-ci. Les résultats obtenus pourraient cependant aussi s'expliquer par une augmentation de la formation de résidus non extractibles. Dans le sol non planté (T12 NP, Figure 55 B), la proportion en BaA associé physiquement/chimiquement n'est pas significativement différente de celle mesurée à T6 NP ($p > 0,05$). En revanche, un pourcentage en polluant significativement plus faible a été détecté dans la fraction facilement désorbable à T12 NP par rapport à T6 NP ($40,6 \pm 0,3 \%$ contre $61,9 \pm 3,0 \%$ respectivement, $p < 0,05$) pour atteindre une valeur ($38,8 \pm 3,1 \%$) identique à celle de T0 ($p > 0,05$). Cette diminution est aussi associée à la faible teneur en BaA total déterminée par la somme des fractions et pourrait s'expliquer par la formation de résidus non extractibles ou par une dégradation du polluant. Comparé à T12 P, du BaA a été détecté dans la fraction humine ($1,1 \pm 0,8 \%$) mais cette concentration n'est pas significativement différente de celles mesurées à T6 NP et T0 ($p > 0,05$). Aucune différence significative n'a également été détectée pour la fraction dissoute ($p > 0,05$). Contrairement au sol non planté (T12 NP), la répartition du HAP du sol planté (T12 P) a été fortement modifiée ce qui traduit un impact de l'espèce végétale sur la mobilité du composé. Ainsi, les résultats peuvent s'expliquer soit par la formation de résidus non extractibles, avec les mêmes hypothèses qui ont émises lors de l'interprétation des données du dosage total en BaA à T12 (paragraphe 3.1.4.1.), soit par la dégradation du polluant comme cela a également été suggéré lors des analyses du dosage total. La dégradation du BaA pourrait provenir d'une augmentation de sa biodisponibilité grâce, par exemple, à une teneur en surfactants plus importante due à la présence de la plante. En effet, les racines peuvent sécréter des surfactants comme la saponine et la lécithine qui vont solubiliser les HAP (Soeder *et al.*, 1996). Aussi, la croissance racinaire peut conduire à une destruction des agrégats de sol (Materechera *et al.*, 1994) libérant alors les molécules de BaA piégées, et les exsudats produit par la plante ont pu également augmenter le pH du sol (Hinsinger *et al.*, 2003) ce qui a désorbé le polluant (Laor *et al.*, 1998; Ping *et al.*,

2006; Yang *et al.*, 2001). De plus, les racines peuvent libérer des acides organiques de faible poids moléculaire comme l'acide citrique et l'acide malique (Gao *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2013) qui vont pouvoir dissoudre de la matière organique en solution (Kong *et al.*, 2013), libérant alors les composés fixés, mais également perturber les associations organo-minérales de la fraction solide du sol en produisant des complexes solubles (Jia *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2013). La diminution de la teneur en BaA facilement désorbable confirmerait alors le fait que la dégradation du polluant semble intervenir dans cette fraction. L'étude de Cornelissen et ses collaborateurs (1998) suggère en effet que la possible dégradation des HAP peut être prédite grâce à la fraction facilement désorbable.

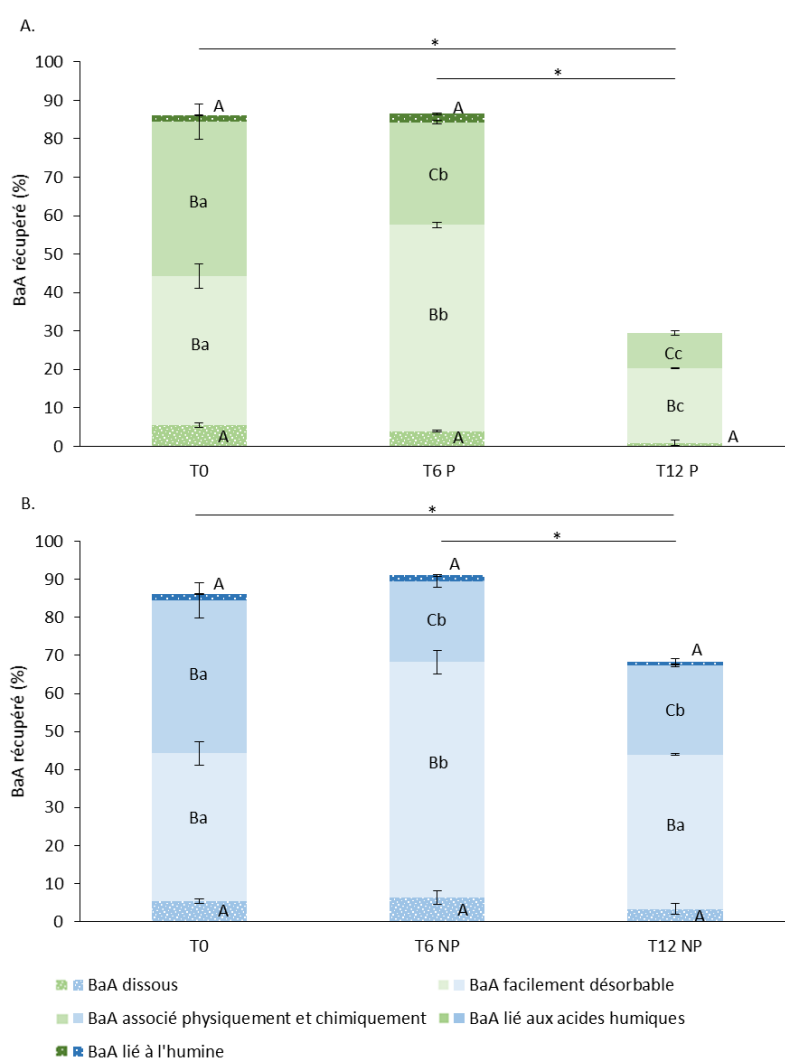


Figure 55. Pourcentage de BaA récupéré (moyenne $\pm$ écart type, $n=3$) dans les différentes fractions du sol au cours du temps (de T0 à T12) dans le sol planté (A) et non planté (B). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre les différentes fractions d'un prélèvement pour les deux types de sol ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre les différents prélèvements d'une même fraction pour chaque type de sol ($p < 0,05$). L'astérisque représente une différence significative entre les prélèvements de chaque type de sol au niveau du total des fractions ($p < 0,05$).

3.1.4.3. Conclusion

Après 6 mois d'exposition, la teneur et la mobilité du BaA ont évolué de la même manière que le sol soit planté ou non. A partir de 12 mois, une influence de l'espèce végétale apparaît avec une dissipation 3 fois plus importante du polluant dans le sol planté que dans le sol non planté. Cet effet peut s'expliquer soit par une augmentation de la biodisponibilité du contaminant, conduisant alors à sa dégradation microbienne, soit par une augmentation de son adsorption aux particules de sol, engendrant alors une formation plus importante de résidus non extractibles.

3.1.5. Evaluation de la toxicité des sols

La toxicité des sols a été analysée par différents tests écotoxicologiques au cours du temps afin d'évaluer l'impact de la plante et des microorganismes sur ce paramètre. Lors d'un procédé de remédiation, il est important de prendre en compte le caractère toxique du polluant puisque celui-ci ne va pas forcément dépendre de sa teneur totale mais de sa biodisponibilité et de la présence de ses métabolites de dégradation. C'est pourquoi l'évaluation de la toxicité des sols en parallèle des analyses chimiques est primordiale. Aussi, il est important d'utiliser divers tests avec des niveaux trophiques différents car les effets peuvent varier selon les organismes et d'évaluer plusieurs critères d'effet pour avoir une analyse globale de l'impact du polluant.

3.1.5.1. Essai aigu : *Eisenia fetida*

La mortalité de vers de terre adultes *Eisenia fetida* a été déterminée après 14 jours d'exposition et est présentée dans le tableau 31. Le sol pollué au BaA présente une toxicité aiguë envers les vers de terre avant plantation de MxG (T0) puisque 100 % des individus n'ont pas survécu. Une faible toxicité est toutefois observée dans le sol non pollué à T0 (20 ± 13 % de mortalité) mais les résultats ne sont pas significativement différents de ceux des prélèvements T6 P et T12 P (sol non pollué ; $p > 0,05$). Chez les vers de terre, la toxicité des polluants semblerait provenir des fractions dissoute (très biodisponible) (Kelsey *et al.*, 1997; Krauss *et al.*, 2000) et facilement désorbable (Kelsey *et al.*, 1997; Kreitinger *et al.*, 2007) des

composés dans le sol. Le BaA contenu dans ces fractions représente 44 % (Figure 55) ce qui correspond à la moitié de ce qui a été extrait. L'accumulation des HAP est possible par ingestion de matière organique et par pénétration à travers l'épiderme *via* des contacts entre les pores et l'eau et/ou la surface des matières particulaires (Ma *et al.*, 2012b). Ainsi, le BaA contenu dans les deux fractions était disponible pour être assimilé par voie cutanée, l'absorption étant facilitée par le caractère hydrophobe du composé puisque le corps des vers possède une teneur relativement importante en lipide.

Après 6 mois de plantation (T6 P), aucun effet toxique n'est observé pour les deux types de sol (0 ± 0 % de mortalité). Ce résultat est inattendu pour le sol contaminé puisqu'une augmentation de la biodisponibilité du polluant a été observée (Figure 55). Cela peut s'expliquer par la présence de micelles provenant des surfactants produits par les microorganismes. La plante ne semble pas être impliquée dans la production de surfactant car la répartition des différentes formes du BaA est la même que le sol soit planté ou non (Figure 55). A une teneur supérieure à la concentration micellaire critique (concentration en surfactant à laquelle les monomères commencent à s'assembler en agrégats colloïdaux ordonnés), les polluants (hydrophobes) peuvent directement se partitionner dans le cœur hydrophobe du centre de la micelle (Edwards *et al.*, 1991), ce qui conduit à leur désorption du sol et augmente leur biodisponibilité. Cependant, plusieurs études ont montré que les polluants n'étaient pas tout de suite disponibles aux organismes puisqu'ils étaient séquestrés dans les micelles des surfactants (Barkay *et al.*, 1999; Grimberg *et al.*, 1996; Guha and Jaffé, 1996; Volkerling *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997; Zhang and Miller, 1992). Par conséquent, le BaA ne serait pas directement disponible pour les vers de terre, réduisant ainsi son effet toxique. Ceci a été confirmé par l'étude de Volkerling et ses collaborateurs (1995) où la toxicité du naphthalène a été réduite lorsque le composé était présent dans des micelles. De plus, cet effet peut également expliquer l'absence de dégradation du BaA à T6 (Figures 54 et 55), celui-ci n'étant pas disponible pour la dégradation microbienne (Barkay *et al.*, 1999; Grimberg *et al.*, 1996; Guha and Jaffé, 1996; Volkerling *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997; Zhang and Miller, 1992).

A la fin de l'expérimentation (T12 P), comme pour T6 P, aucune mortalité n'est observée pour les deux types de sol (0 ± 0 % de mortalité). Ce résultat, pour le sol contaminé, peut s'expliquer par la diminution de la teneur en BaA (Figures 54 et 55). Si la dissipation du

polluant provient de la formation de résidus non extractibles, le BaA n'a alors pas pu impacter les individus puisque la toxicité des polluants envers les vers de terre semble provenir des fractions dissoute (Kelsey *et al.*, 1997; Krauss *et al.*, 2000) et facilement désorbable du sol (Kelsey *et al.*, 1997; Kreitinger *et al.*, 2007). La concentration en BaA restante dans ces deux fractions (20,26 % ; Figure 55) s'avère alors insuffisante pour présenter une toxicité comparé à T0 (44 % ; Figure 55). En revanche, si la dissipation du polluant provient de la dégradation microbienne, cela signifie que la biodisponibilité du composé est devenue plus importante grâce à une diminution de sa concentration dans la phase micellaire. En effet, la libération des polluants contenus dans les micelles peut être un processus très long car les coefficients cinétiques sont, en général, plus faibles que pour leurs entrées (Grimberg *et al.*, 1996). De plus, contrairement à T6, la plante a probablement pu augmenter davantage la biodisponibilité du BaA (Figure 55) selon plusieurs hypothèses comme cela a été suggéré lors de l'interprétation des résultats obtenus à T12 par le dosage des différentes formes de biodisponibilité du BaA (paragraphe 3.1.4.2.). Les résultats de toxicité indiqueraient alors que les éventuels métabolites de dégradation du polluant s'avèrent peu ou pas toxiques, complètement dégradés, ou piégés dans le sol.

En ce qui concerne la comparaison des sols planté et non planté à T12, aucune mortalité n'a été déterminée pour les sols contaminé (SC) et non contaminé (SNC) (0 ± 0 % de mortalité). Ceci semble indiquer que la diminution de la toxicité dans le sol contaminé non planté provient également d'une baisse de la teneur en polluant (Figures 54 et 55). Cependant, le pourcentage de BaA restant dans les fractions dissoute et facilement désorbable du sol non planté est identique à celui de T0 (44 %, Figure 55). Ainsi, l'absence de toxicité du sol contaminé non planté semble plutôt provenir du fait que des molécules de BaA soient toujours piégées dans les micelles des surfactants produits par la microflore tellurique. La présence de MxG dans le sol contaminé aurait alors permis de libérer les molécules piégées *via* probablement la dégradation des surfactants (Scott and Jones, 2000; Volkering *et al.*, 1998; Ying, 2006) par des microorganismes sélectionnés et stimulés par la plante.

Tableau 31. Pourcentage de mortalité de vers de terre adultes *Eisenia fetida* (moyenne $\pm$ écart type, $n=3$) exposés pendant 14 jours dans du sol non pollué (sol SNC) et pollué (sol SC) en présence de la plante (P) au cours du temps (de T0 à T12). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre les deux types de sol à chaque prélèvement ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre les différents prélèvements pour chaque type de sol ($p < 0,05$).

Prélèvement	SNC	SC
T0	20 $\pm$ 13 ^A	100 $\pm$ 0 ^{Ba}
T6 P	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0 ^b
T12 P	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0 ^b

3.1.5.2. Essai chronique : *Hordeum vulgare*

Les mesures de l'émergence de graines d'orge obtenues après 4 jours d'exposition dans les sols planté contaminé (SC) et non contaminé (SNC) au cours du temps sont présentées sur la figure 56. Avant plantation (T0), le pourcentage de germination est significativement plus faible ($p < 0,05$) dans le sol pollué (SC ; 62,5 $\pm$ 12,5 %) que dans le sol non pollué (SNC ; 87,5 $\pm$ 5,4 %), ce qui traduit un impact toxique et rapide du BaA sur l'émergence de l'orge. Cet effet peut être expliqué par la forte biodisponibilité du HAP (44 % répartis dans les fractions dissoute et facilement désorbable ; Figure 55) mais également par sa forte hydrophobicité. Comme les graines sont potentiellement en contact avec le polluant, celui-ci peut y pénétrer et affecter leur système enzymatique. En effet, dans l'étude de Kummerová et Kmentová (2004), il a été suggéré que la présence de fluoranthène dans l'endosperme affectait l'assimilation d'eau dans les graines par l'inhibition de l'activité de l'acide gibbérellique ainsi que plusieurs enzymes hydrolytiques. De plus, le BaA a pu s'adsorber à la surface des graines ce qui a réduit la prise d'eau.

Après plantation de MxG (T6 P et T12 P), une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux de germination est observée dans le sol contaminé (SC) à T6 (95,8 $\pm$ 2,4 %) et T12 (85,4 $\pm$ 4 %) par rapport à T0 avec des valeurs similaires ($p > 0,05$) à celles du sol non pollué (SNC). Comme pour le test avec *Eisenia fetida*, cette absence de toxicité dans le sol contaminé (SC) à T6 peut s'expliquer par la non disponibilité directe du BaA aux graines d'orge en raison de son piégeage dans des micelles produites par les microorganismes du sol, et à T12 par la diminution de la teneur en polluant (dégradation ou formation de résidus non extractibles).

En ce qui concerne la comparaison des sols planté et non planté à T12, aucune toxicité n'a été déterminée pour les sols contaminé (SC ; 85,4 $\pm$ 4 % pour le sol planté contre 81,3 $\pm$ 4 %

pour le sol non planté) et non contaminé (SNC ; $87,5 \pm 7,2$ % pour le sol planté contre $91,7 \pm 3,4$ % pour le sol non planté). Ceci indique comme pour le test de mortalité des vers de terre que des molécules de BaA seraient toujours piégées dans les surfactants produits par la microflore dans le sol non planté, empêchant alors une toxicité. Les surfactants du sol planté auraient quant à eux été dégradés par des microorganismes stimulés par MxG ce qui a rendu le BaA disponible à la dégradation et donc présent en plus faible quantité dans le sol, cette concentration n'induisant alors aucune toxicité.

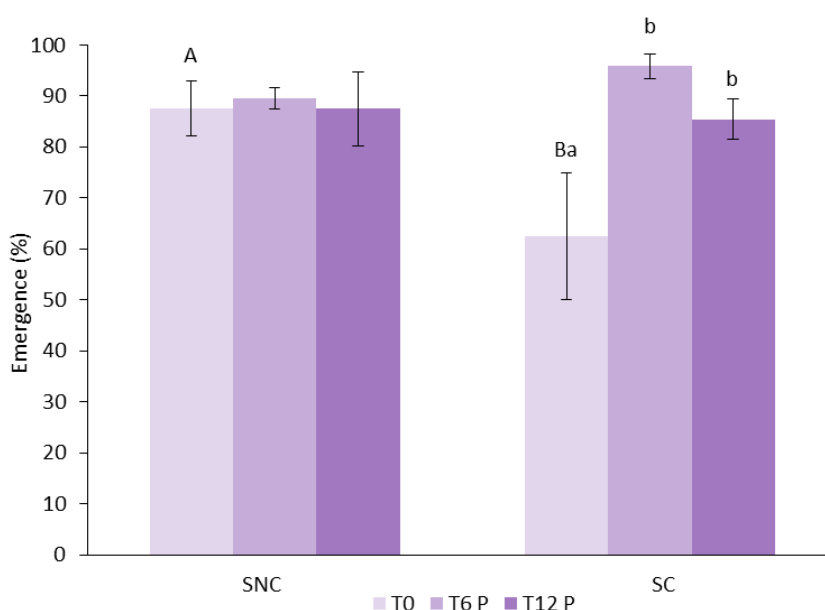


Figure 56. Pourcentage d'émergence de graines d'orge (moyenne $\pm$ écart type, $n=4$) exposées pendant 4 jours dans les sols non pollués (sol SNC) et pollués (sol SC) en présence de la plante (P) au cours du temps (de T0 à T12). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre les deux types de sol à chaque prélèvement ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre les différents prélèvements pour chaque type de sol ($p < 0,05$).

La biomasse des pousses sèches d'orge mesurée 14 jours après l'émergence des graines dans les différents types de sol au cours du temps est présentée sur la figure 57. Aucune toxicité n'a été détectée que ce soit à T0, T6 P ou T12 P dans le sol contaminé (SC ; Figure 57 A) puisque les valeurs mesurées à chaque prélèvement sont similaires ($p > 0,05$) à celles du sol non contaminé (SNC). Ainsi, il apparaît que l'émergence des graines est plus sensible au BaA que la croissance des pousses. Ce résultat est contraire à celui obtenu par d'autres études où la germination a été peu affectée et la biomasse inhibée en présence de HAP (Anyanwu and Semple, 2015; Eom *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2006; Sverdrup *et al.*, 2003). Puisqu'aucune de ces études n'utilisent l'orge, cette différence peut être attribuée à l'espèce

végétale utilisée pour réaliser le test d'écotoxicité, mais également par le type de polluant et sa concentration, celle-ci étant généralement bien supérieure à celle utilisée dans cette étude.

Cependant, lors de la comparaison du sol planté et non planté à T12 (Figure 57 B), une biomasse significativement supérieure ($p < 0,05$) est observée dans le sol non planté contaminé par rapport au sol planté (SC). Ce résultat peut être expliqué par un phénomène d'hormèse, où cette concentration spécifique en BaA du sol stimule la croissance des pousses d'orge. Selon l'étude de Maliszewska-Kordybach et Smreczak (2000), les sols pollués par une concentration en HAP inférieure à 10 mg.kg^{-1} stimule la croissance des plantes au début de leur développement plutôt que de l'inhiber. Les concentrations obtenues dans le sol contaminé planté sont contraires à cette hypothèse puisque 6 mg.kg^{-1} de BaA ont été dosés à T12 lors de l'extraction totale en polluant (12 % de BaA récupéré, Figure 54) et $14,72 \text{ mg.kg}^{-1}$ ont été dosée lors de l'extraction séquentielle du BaA (29,44 % de BaA récupéré, Figure 55).

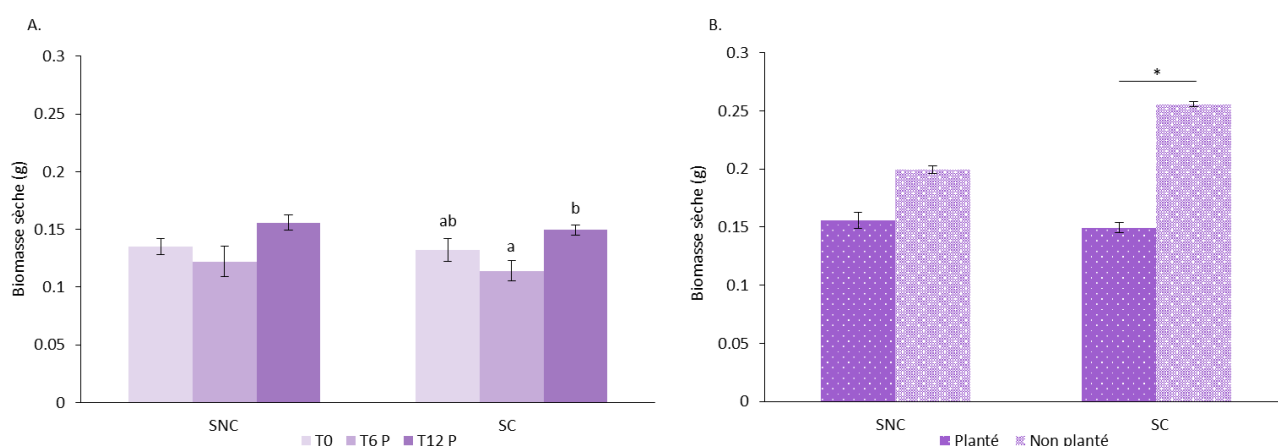


Figure 57. Biomasse des pousses sèches d'orge (moyenne $\pm$ écart type, $n=4$) exposées pendant 14 jours après l'émergence des graines dans les sol non pollué (SNC) et pollué (SC) plantés (P) au cours du temps (de T0 à T12, A), et dans les sols non pollué (SNC) et pollué (SC) à T12 en présence ou non de la plante (B). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre les différents prélèvements pour chaque type de sol ($p < 0,05$, A). L'astérisque représente une différence significative entre le sol planté et non planté pour chaque type de sol ($p < 0,05$, B).

3.1.5.3. Essai génotoxique : *Vicia faba*

La génotoxicité des lixiviats des sols a été évaluée, au cours du temps, par le nombre de micronoyaux (provenant d'une cassure chromosomique ou d'un dysfonctionnement du fuseau mitotique) présents dans les racinaires secondaires de fève après 37h d'exposition

(Figure 58). Par rapport au témoin négatif, un nombre significativement plus élevé de micronoyaux ($p < 0,05$) est observé avant plantation (T0) dans le sol contaminé (SC). Ceci confirme le caractère cancérigène et mutagène du BaA. Cependant, il n'y a aucune différence significative ($p > 0,05$) entre le sol contaminé (SC) et non contaminé (SNC) à T0. Aussi, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été obtenue entre ces deux types de sol à T6 P et T12 P, ainsi qu'entre le sol planté et non planté pour chaque type de sol à T12 ($p > 0,05$). Puisque le test a été réalisé à partir des lixiviats, l'absence d'une réelle toxicité peut être expliquée par la forte hydrophobicité du BaA. Ceci est confirmé par la faible concentration en polluant obtenue dans la fraction dissoute quel que soit le prélèvement (Figure 55). Afin d'approfondir les résultats, des essais en exposant directement les racines de fève dans les sols pourraient être effectués car, en 2013, le même test écotoxicologique a été publié en utilisant le sol comme matrice (ISO 29200, 2013). Celui-ci serait alors plus approprié pour les polluants hydrophobes. Cependant, Marcato-Romain et ses collaborateurs (2009) qui ont évalué la toxicité d'un sol pollué aux HAP (dont du BaA à 51 mg.kg^{-1}) avec les deux tests ont montré des effets génotoxiques pour les deux types d'exposition.

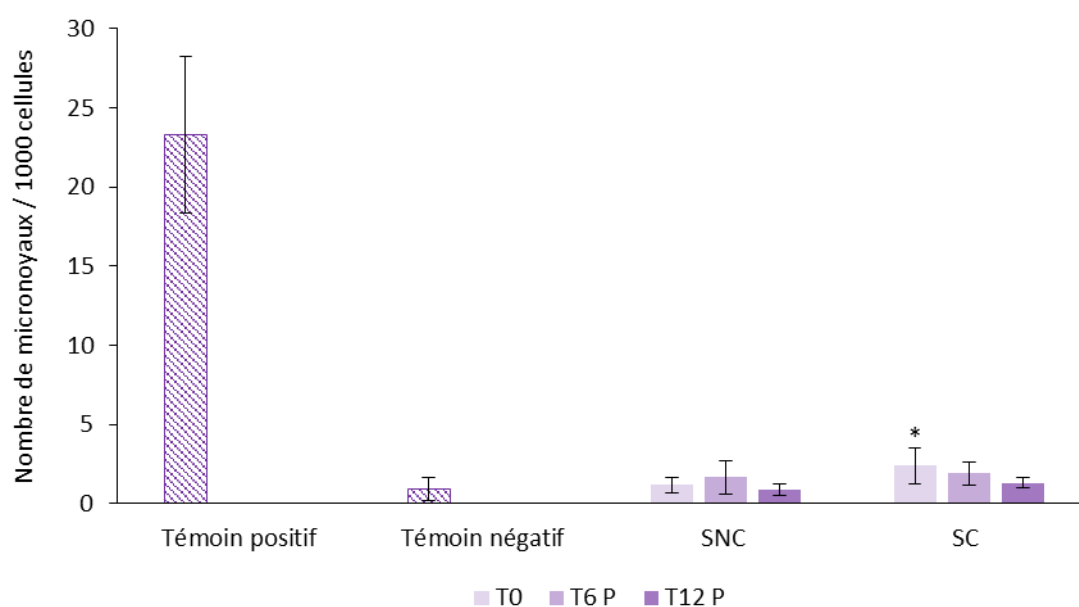


Figure 58. Nombre de micronoyaux pour 1000 cellules dans les racines secondaires de *Vicia faba* (moyenne $\pm$ écart type, $n=2$ lames $\times$ 6 individus) après 37 h d'exposition dans les sols plantés (P) contaminé (SC) ou non (SNC) au cours du temps (de T0 à T12). Tous les échantillons sont significativement différents du témoin positif ($p < 0,05$). L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin négatif ($p < 0,05$).

3.1.5.4. Conclusion

Au début de l'expérimentation, le BaA présente une toxicité significative envers les vers de terre et la germination des graines d'orge. Cette toxicité finit par disparaître dès 6 mois d'exposition certainement grâce à la présence de micelles provenant de surfactants produits par les microorganismes du sol qui ont piégé le polluant. A la fin de l'expérimentation, l'absence d'effet toxique est probablement due à la persistance du piégeage du contaminant dans les micelles pour le sol non planté et à la diminution de la teneur en BaA dans le sol planté. La présence de MxG a certainement permis la stimulation de microorganismes spécifiques qui ont dégradé les surfactants et donc libéré le polluant, celui-ci devenant alors disponible à la dégradation microbienne ou pour la formation de résidus non extractibles. La concentration en BaA mesurée dans le sol planté serait alors insuffisante pour générer une toxicité.

3.1.6. Conclusion générale

L'expérience de phyto/rhizoremédiation a permis de mettre en évidence l'impact toxique du BaA sur les organismes et l'influence de MxG sur sa concentration et sa biodisponibilité dans les sols. Au début de l'expérimentation, le polluant alors présent à une concentration de 50 mg.kg⁻¹, montre une toxicité aiguë envers le vers de terre *Eisenia fetida* et l'herbe d'orge, mais également envers la microflore tellurique puisqu'une diminution de la densité de gènes microbiens (ARNr 16S et ARNr 18S) a été obtenue, suggérant une mortalité. Cet effet peut notamment être expliqué par la biodisponibilité du contaminant, 44,2 % du composé se trouvant dans la fraction dissoute et facilement désorbable du sol, ce qui représente environ la moitié de la concentration totale en BaA extrait (86,2 % pour l'extraction séquentielle). Après 6 mois d'exposition, en présence de MxG, le composé ne présente plus de toxicité bien que sa concentration totale n'ait pas diminué et sa biodisponibilité augmenté, une partie du BaA associé physiquement et chimiquement s'étant *a priori* retrouvée dans la fraction facilement désorbable. L'absence de toxicité semble alors principalement s'expliquer par un piégeage du polluant dans les micelles des surfactants produits par la microflore tellurique qui ont permis sa désorption. Cet effet ne semble cependant pas être dû à la présence de la plante puisque la concentration et la

mobilité du contaminant ont évolué de la même manière dans le sol non planté. Par contre, MxG montre une influence sur la microflore qui s'avère positive car elle conduit à une diversité bactérienne similaire à celle du sol non contaminé et à une probable stimulation de la croissance des bactéries puisqu'une augmentation du nombre de copies de gènes ARNr 16S et PAH-RHD α GP a été obtenue. Lors d'un stress toxique, MxG semble alors stimuler les microorganismes appropriés en augmentant ou en modifiant la composition de ses exsudats racinaires pour qu'ils agissent sur le polluant afin qu'il ne présente plus un risque pour la plante. En absence de MxG, le BaA s'avère en effet toujours néfaste puisque la diversité bactérienne se montre totalement différente du sol non contaminé et le nombre de gènes ARNr 16S continue de diminuer. A la fin de l'expérimentation (12 mois), les tests d'écotoxicité n'ont révélé aucune toxicité du BaA, comme à 6 mois d'exposition, que le sol soit planté ou non. Ce résultat pourrait être expliqué par la diminution de la teneur totale en polluant dans les deux types de sol. Cependant, la concentration en BaA dans les fractions dissoute et facilement désorbable est similaire à celle du début d'exposition pour le sol non planté, ce qui suggère que des molécules sont toujours piégées dans les micelles des surfactants. Les coefficients cinétiques de libération des polluants dans les micelles sont en effet généralement plus faibles que pour leurs entrées (Grimberg *et al.*, 1996). En revanche, pour le sol planté avec MxG, l'absence de toxicité du BaA semble plutôt provenir de sa concentration car elle est beaucoup plus faible que dans le sol non planté (12 % de BaA extrait contre 51,7 % dans le sol non planté pour l'extraction totale). La plante aurait alors induit la dégradation des surfactants par stimulation de microorganismes spécifiques ce qui a conduit à une libération des molécules de BaA. Pour les deux sols, le polluant qui s'est apparemment dissipé de la fraction facilement désorbable, a pu être séquestré dans le sol pour former des résidus non extractibles et/ou dégradé. Cette dernière hypothèse semble la plus plausible car une augmentation du nombre de copies de gènes ARNr 16S et PAH-RHD α GP a été obtenue dans les deux sols par rapport au début et à 6 mois d'exposition, suggérant que l'augmentation de la croissance bactérienne a causé une augmentation de la dégradation du BaA. De ce fait, la microflore semble s'être adaptée à la présence du polluant dans le sol non planté, et MxG semble avoir stimulé la croissance microbienne dans le sol planté. Cette stimulation a alors conduit à un nombre plus important de copies de gènes bactériens (ARNr 16S et PAH-RHD α GP) ainsi qu'à une augmentation de la densité

de gènes ARNr 18S par rapport au sol non planté, ce qui expliquerait la plus forte dissipation du BaA dans le sol planté. De plus, dans ce sol, des espèces bactériennes appartenant au genre *Rhodococcus* et à la classe des Alphaprotéobactéries ont été isolées comme étant capable de métaboliser le BaA, ainsi qu'une souche fongique correspondant à *Fusarium oxysporum*.

La possible métabolisation microbienne du BaA dans le sol non planté indiquerait alors que le sol standard artificiel possède des capacités catalytiques grâce certainement aux microorganismes qui proviennent de sa tourbe car les molécules de la matière organique possèdent une similarité structurale avec les HAP.

3.2. Expérience de bioaugmentation/biostimulation

Dans le but de préciser l'impact de la rhizosphère de MxG dans la dissipation du BaA, et plus spécifiquement, le rôle de ses exsudats et de ses microorganismes rhizosphériques, une expérience de bioaugmentation/biostimulation d'une durée de 105 jours a été réalisée à partir d'un sol standard contaminé à une concentration environnementale de 50 mg.kg⁻¹ comme pour la première expérimentation (phyto/rhizoremédiation). Un consortium bactérien et une souche fongique isolés lors de l'expérience de phyto/rhizoremédiation ont été utilisés seuls ou en association pour le procédé de bioaugmentation. En ce qui concerne la biostimulation, quatre molécules synthétiques qui sont retrouvées dans les exsudats de MxG (métabolites secondaires) ont été utilisées à partir de deux mélanges : quercétine, apigénine, catéchine (E1) et quercétine, apigénine, catéchine, acide gallique (E2), ainsi que la plante en elle-même. La combinaison des deux procédés (bioaugmentation et biostimulation) a également été évaluée. Des prélèvements de sol ont été effectués au début de l'expérimentation (T0), à 3 jours (T1), 15 jours (T2) et 105 jours (T3) d'exposition. La microflore du sol (diversité et densité), la teneur en polluant (totale et biodisponible) et sa toxicité ont alors été analysées.

3.2.1. Sélection du consortium bactérien

Lors de l'expérience de phyto/rhizoremédiation, deux consortia (C1 et C2) bactériens ainsi qu'une souche fongique (CH) provenant de la rhizosphère de MxG (à partir du sol pollué et

planté en fin d'exposition) avaient été isolés pour leurs capacités à tolérer et/ou dégrader le BaA (paragraphe 3.1.3.3.). Un seul des consortia, le plus efficace en termes de croissance et de dégradation, sera utilisé pour l'expérience de bioaugmentation/biostimulation.

Durant 5 semaines, la croissance et la capacité de dégradation du BaA des deux consortia ont été évaluées en présence ou en absence du champignon ainsi que des deux mélanges d'exsudats racinaires (E1 : quercétine, apigénine, catéchine ; E2 : quercétine, apigénine, catéchine, acide gallique) par des mesures hebdomadaires.

La croissance bactérienne analysée par dosage spectrophotométrique à 620 nm est présentée sur la figure 59. Pendant toute la durée de l'exposition, les consortia se sont développés quelles que soient les conditions. Ceci indique que le BaA n'a pas eu d'effets toxiques sur les microorganismes et confirme la tolérance de ces derniers envers le polluant. Dès la première semaine, les milieux C2 et C2+CH se sont démarqués avec une croissance plus importante jusqu'à 4 semaines, tous les autres possédant une densité cellulaire plus faible et similaire entre eux. Par contre, à la fin de l'exposition (5 semaines), la croissance bactérienne de ces deux milieux (C2 et C2+CH) semble atteindre un plateau (phase stationnaire) et présente un nombre de bactéries proche de celui des milieux C1 et C1+CH. Quant aux microorganismes des milieux contenant des exsudats, leur croissance est toujours en phase exponentielle puisqu'ils continuent de croître. Parmi eux, une séparation est toutefois visible entre les milieux contenant le consortium C1 et ceux contenant le consortium C2, avec une densité cellulaire plus importante pour les milieux possédant le consortium C1. Il n'y a donc pas de différence selon le mélange d'exsudats utilisé. De plus, quelles que soient les conditions, la présence du champignon n'a pas eu d'influence sur la croissance bactérienne ce qui indique qu'il n'entre pas en compétition avec les bactéries pour les nutriments.

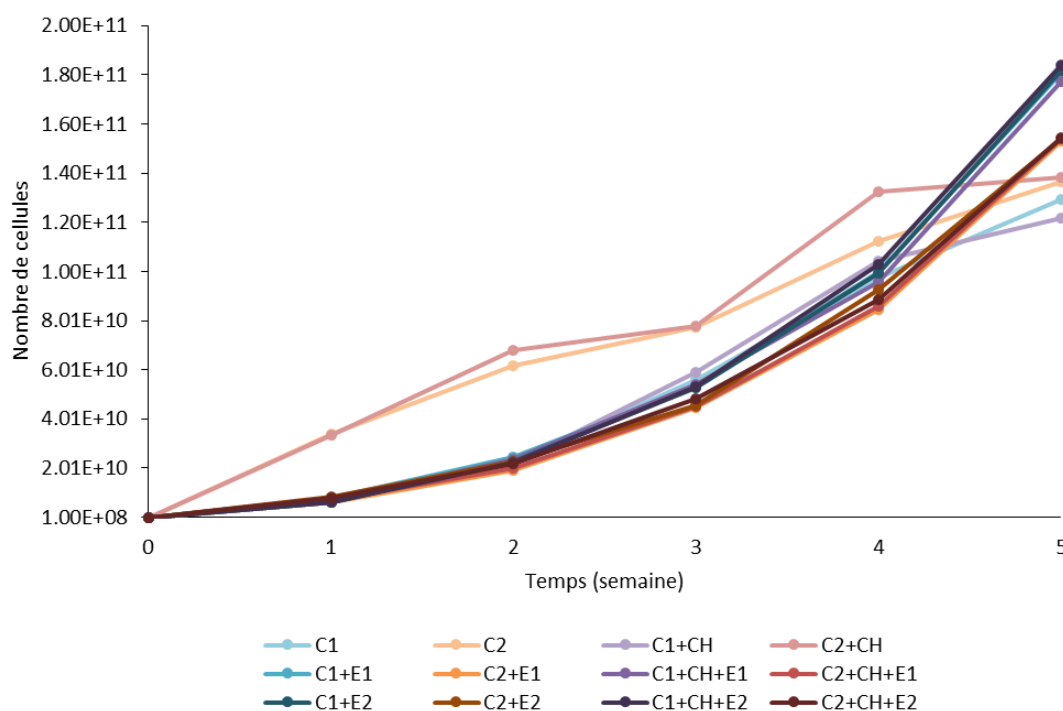


Figure 59. Croissance bactérienne au cours du temps (5 semaines) des deux consortia (C1 et C2) dans du milieu Bushnell-Haas contaminé au BaA en association ou non avec le champignon (CH) ainsi qu'en présence ou non des deux mélanges d'exsudats racinaires (E1 et E2).

Le pourcentage de BaA total extrait dans les milieux est présenté sur la figure 60. Une dégradation du polluant est observée pour les deux consortia quelles que soient les conditions ce qui confirme la capacité de dégradation du BaA des microorganismes. Dès la 2^{ème} semaine, une diminution plus importante de la teneur en polluant est observée dans les milieux C2 et C2+CH ce qui explique leur plus forte croissance (Figure 59). En effet, puisque les microorganismes ne sont pas en présence d'exsudats, ils vont directement utiliser le BaA comme source de carbone. En revanche, pour les milieux qui en contiennent, la microflore va plutôt d'abord utiliser les exsudats car les composés sont plus facilement dégradables, ce qui conduit à une métabolisation réduite du polluant. Le consortium C1 s'avère alors moins efficace dans la dégradation du polluant par rapport au consortium C2 puisqu'il présente une teneur en BaA plus importante en absence d'exsudats. A la fin de l'exposition (5 semaines), le plus faible pourcentage de BaA récupéré correspond aux milieux C2 (11,1 %), C1+E1 (13,9 %) et C2+CH (15,8 %), suivi par C1+CH (21,8 %) et C1 (22,4 %). Les milieux C1 et C1+CH finissent alors par avoir une teneur en contaminant proche de celles des milieux C2 et

C2+CH bien qu'ils aient été moins efficaces en début d'exposition. A part pour l'échantillon C1+E1, ceci indique que les consortia dégradent mieux le BaA en absence d'autres sources de carbone comme cela a été expliqué précédemment. Ainsi, l'entrée en phase stationnaire des microorganismes (Figure 59) montre qu'il n'y a certainement plus assez de BaA pour maintenir leur croissance. Ensuite, pour les autres échantillons, le pourcentage de BaA récupéré ne semble pas dépendre du consortium, du mélange d'exsudats ou de la présence du champignon, ce dernier n'ayant également aucun impact dans les milieux sans exsudats.

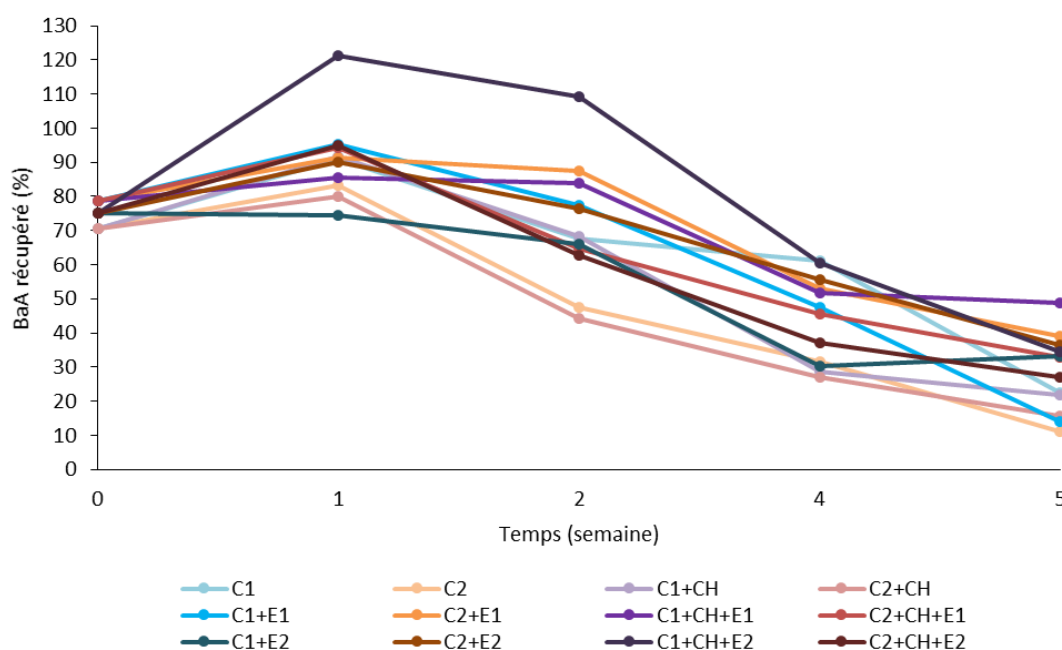


Figure 60. Pourcentage de BaA total récupéré au cours du temps (5 semaines) dans les milieux Bushnell-Haas contenant les consortia (C1 et C2) en association ou non avec le champignon (CH) ainsi qu'en présence ou non des deux mélanges d'exsudats racinaires (E1 et E2).

Le choix du consortium s'est alors porté sur C2 puisque c'est celui qui a réagi le plus rapidement à la présence du BaA. Cependant, il aurait été intéressant de poursuivre plus longtemps l'expérience afin d'analyser l'évolution de la teneur en BaA dans les milieux contenant les exsudats puisque la croissance des microorganismes était encore en phase exponentielle.

3.2.2. Evaluation de la microflore des sols

La microflore des sols a été analysée par des techniques de biologie moléculaire afin d'évaluer l'impact de la bioaugmentation seule et de son association à la biostimulation et à la phyto/rhizoremédiation sur la diversité bactérienne par TTGE, mais aussi sur la densité fongique et bactérienne totale ainsi que bactérienne dégradante par qPCR. Il est en effet important de suivre ces paramètres lors d'un procédé de remédiation des sols puisque les microorganismes jouent un rôle fondamental dans la dégradation des polluants.

3.2.2.1. Diversité bactérienne

Les matrices de dissimilarité obtenues à partir des gels de TTGE ont été analysées par nMDS afin de représenter spatialement la distance entre les échantillons. La figure 61 qui représente les conditions sans consortium révèle que la diversité bactérienne des différents types de sol a évolué en fonction du temps d'exposition. Une diversité similaire entre les échantillons à T0 et T1 est toutefois observée, indiquant que les bactéries n'ont pas eu le temps d'évoluer puisque seulement 3 jours séparent ces deux prélèvements. En ce qui concerne les différents traitements (E1, E2 et MxG), seul le sol en présence de la plante (MxG) possède une diversité différente de tous les autres à T2 (15 jours) et T3 (105 jours) avec une différence plus marquée à T2. MxG conduit donc à une modification importante de la structure des communautés bactériennes contrairement aux mélanges d'exsudats (E1 et E2) puisqu'elle libère de nombreux rhizodépôts dont la concentration et la composition peuvent changer au cours du temps, ce qui fait du sol rhizosphérique un milieu particulier. A la fin de l'exposition, la microflore bactérienne des sols sans MxG a fini par s'adapter à la présence du polluant car leur diversité se rapproche de celle avec la plante. Les résultats de cette analyse de nMDS révèlent donc que l'ajout des sources de carbones (E1 et E2) n'a pas d'effet sur la structure des communautés bactériennes indigènes du sol. Ces résultats sont contraires à ceux de Uhlik et ses collaborateurs (2013) où une modification importante de la diversité bactérienne a été obtenue dans un sol contaminé par des polychlorobiphényles (PCB, polluants organiques) en présence de métabolites secondaires de végétaux (naringine, limonène et acide caféique) par rapport à un sol témoin (non amendé en métabolites).

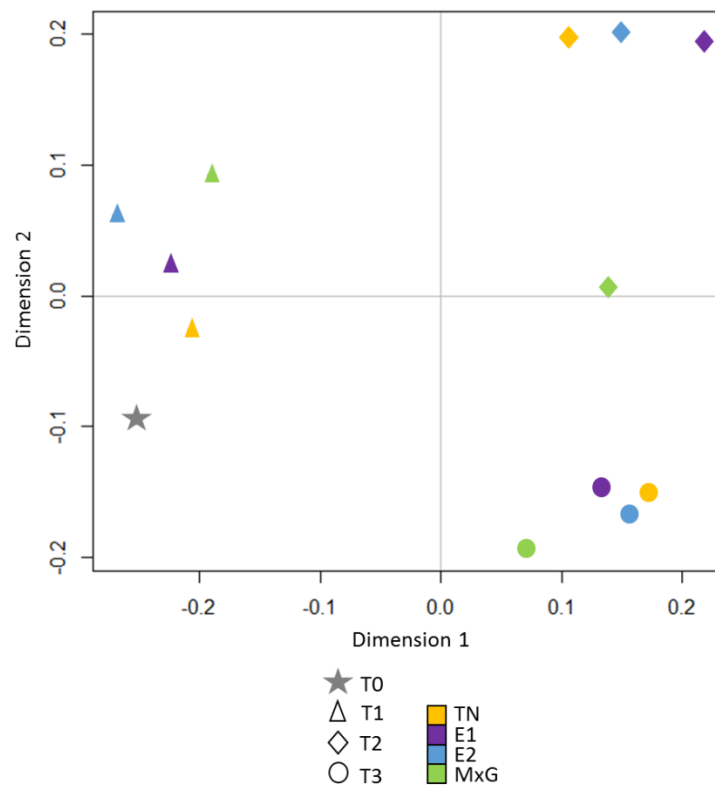


Figure 61. Analyse de nMDS réalisée à partir d'une matrice de dissimilarité générée par la présence/absence de phylotypes sur les gels TTGE obtenus par amplification (PCR) du gène ARNr 16S. Les analyses de TTGE ont été effectuées pour chaque réplicat à partir des extraits d'ADN des sols contaminés sans consortium en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 et E2), de la plante (MxG), et en absence de traitement (TN), aux différents temps de prélèvement (T0, T1, T2 et T3). Stress : 0,0905.

En ce qui concerne l'analyse de nMDS des sols en présence du consortium seul, celle-ci est présentée sur la figure 62. Comme pour les conditions sans consortium (Figure 61), un effet du temps est observé sur la diversité bactérienne. Cependant, l'apport des microorganismes a conduit à une répartition différente des échantillons selon les traitements. En effet, dès T1, une différenciation est distinguée entre les échantillons MxG et E2 et les échantillons TN et E1, ces derniers étant les plus proches de T0. Ainsi, en seulement 3 jours d'exposition, l'ajout du consortium a entraîné une modification importante de la microflore bactérienne des sols en présence de MxG et du mélange d'exsudats E2, suggérant une interaction entre ces derniers et le consortium. Celle-ci peut s'expliquer, par exemple, par un effet stimulateur sélectif de MxG et du mélange E2 envers les microorganismes du consortium, l'augmentation de leur croissance entraînant alors un phénomène de compétition entre eux et la microflore initiale du sol pour les nutriments. Ce phénomène serait alors responsable de la modification de la structure des communautés bactériennes. Après 15 jours

d'exposition (T2), seule la diversité du sol planté (MxG) diffère fortement des autres types de sol (TN, E1 et E2), confirmant tout de même la spécificité de la rhizosphère. A la fin de l'expérimentation (T3), grâce à l'adaptation des microorganismes au cours du temps (105 jours), la structure des communautés est assez similaire quel que soit le traitement avec une différenciation entre les échantillons TN et E1, et les échantillons E2 et MxG comme à T1. Cela semble signifier que le mélange E2 se rapproche le plus des conditions rhizosphériques de MxG que le mélange E1 lorsque le consortium est présent. Ces résultats indiquent donc que la plante produit probablement de l'acide gallique en présence du consortium. L'étude de Lee et ses collaborateurs (2014) a montré que les champignons (de la pourriture blanche) qui oxydaient l'acide gallique dégradaient mieux les HAP (phénanthrène, anthracène, fluoranthène et pyrène). Ainsi, puisque le sol présente déjà des bactéries dégradantes grâce au consortium, la plante doit probablement produire de l'acide gallique afin de stimuler d'autres microorganismes comme des champignons pour dégrader le BaA. De ce fait, en stimulant ces microorganismes, cela modifie la diversité bactérienne des sols.

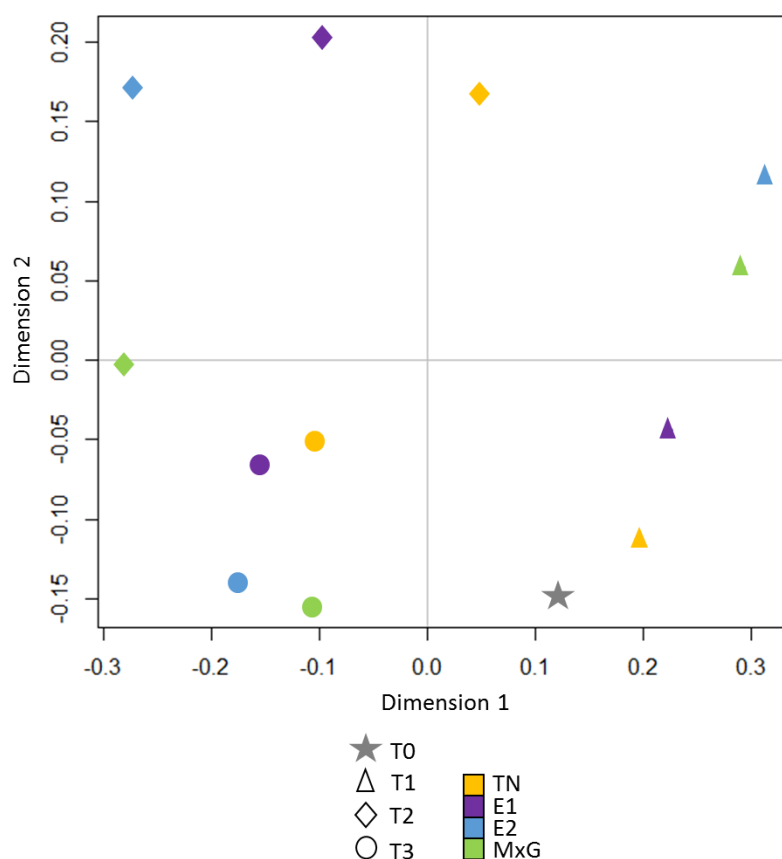


Figure 62. Analyse de nMDS réalisée à partir d'une matrice de dissimilarité générée par la présence/absence de phylotypes sur les gels TTGE obtenus par amplification (PCR) du gène ARNr 16S. Les analyses de TTGE ont été effectuées pour chaque réplicat à partir des extraits d'ADN des sols contaminés avec consortium en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 et E2), de la plante (MxG), et en absence de traitement (TN), aux différents temps de prélèvement (T0, T1, T2 et T3). Stress : 0,1266.

La représentation spatiale de la distance entre les échantillons possédant le consortium et le champignon est présentée sur la figure 63. Encore une fois, le temps d'exposition influence la diversité des sols. Un impact encore plus important de l'apport du champignon est cependant observé sur la répartition des différents traitements. En effet, après 3 jours d'exposition (T1), tous les sols présentent une diversité différente de T0, indiquant que le champignon influence très rapidement la structure des communautés bactériennes quel que soit le traitement. En effet, un des avantages des espèces fongiques est leur incorporation rapide dans la matrice du sol (Sayara *et al.*, 2011). Une différenciation est toutefois constatée entre les échantillons MxG et E2, et les échantillons TN et E1 comme pour les sols possédant seulement le consortium (Figure 62). En revanche, au prélèvement T2, une toute autre répartition des échantillons a été obtenue. Les diversités des sols MxG et E1 se

montrent très proches mais différentes de celles des sols E2 et TN qui elles ne sont pas du tout similaires entre elles. A la fin de l'exposition (T3), ce même constat est observé avec des différences moins marquées. Ainsi, au cours du temps, le mélange d'exsudats E1 permet d'obtenir une diversité similaire au sol planté (MxG) en présence du consortium et du champignon. Cela confirmerait l'hypothèse émise lors de l'analyse de nMDS des échantillons avec le consortium seul (Figure 62) selon laquelle l'acide gallique est produit pour stimuler les champignons ayant des capacités de dégradation du BaA. Ainsi, puisque des champignons dégradants sont déjà présents dans le sol en raison de l'ajout de l'espèce fongique, la plante ne produirait pas ou peu de ce composé. Les sols contenant le mélange E2 possèdent donc une diversité différente des sols MxG, E1 et notamment du sol TN car la présence d'acide gallique (provenant du mélange E2) a due stimuler davantage les champignons ce qui a conduit à une toute autre composition des communautés bactériennes (à T2 et T3).

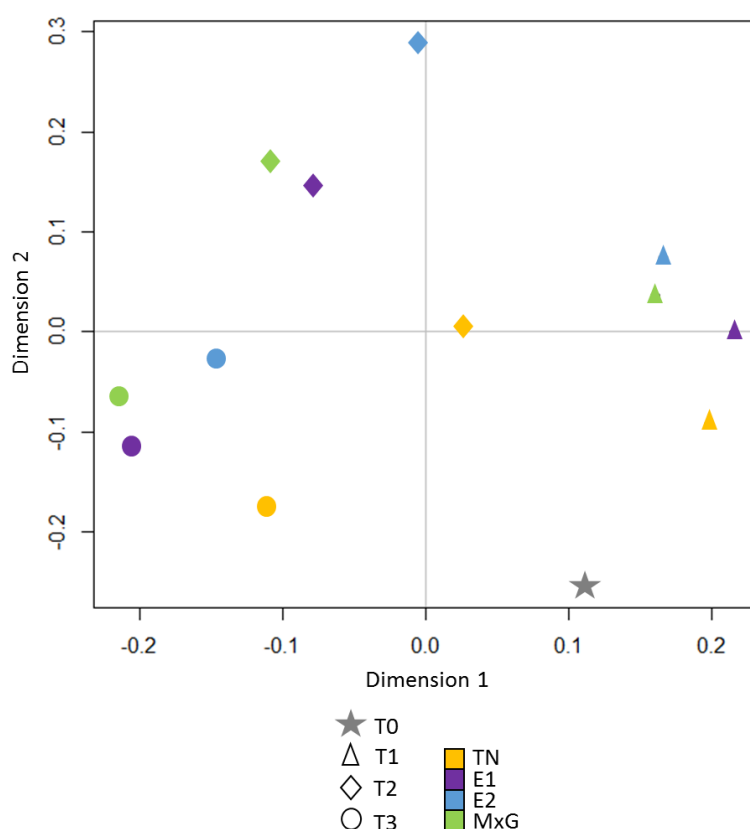


Figure 63. Analyse de nMDS réalisée à partir d'une matrice de dissimilarité générée par la présence/absence de phylotypes sur les gels TTGE obtenus par amplification (PCR) du gène ARNr 16S. Les analyses de TTGE ont été effectuées pour chaque répliquat à partir des extraits d'ADN des sols contaminés avec consortium et champignon en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 et E2), de la plante (MxG), et en absence de traitement (TN), aux différents temps de prélèvement (T0, T1, T2 et T3). Stress : 0,1629.

3.2.2.2. Densité microbienne

Des analyses de qPCR ont été réalisées afin d'évaluer la densité microbienne des sols. Les gènes ARNr 16S et ARNr 18S ont été ciblés afin d'étudier respectivement la densité bactérienne et fongique totale. Dans le but de préciser l'impact de la bioaugmentation seule et de son association à la biostimulation et à la phyto/rhizoremédiation sur les communautés dégradantes des HAP en général, le nombre de copies de gène PAH-RHD α présent chez les bactéries à Gram positif a également été évalué.

3.2.2.2.1. Densité de gènes ARNr 16S

La figure 64 montre le nombre de copies de gène ARNr 16S présent au cours du temps dans les sols des différentes modalités (sans consortium, avec consortium, avec consortium et champignon) en fonction des traitements qui leurs ont été attribués (TN, E1, E2 et MxG).

En début d'exposition (T0), aucune différence significative n'a été détectée entre les différentes formes de bioaugmentation (sans consortium, avec consortium, avec consortium et champignon ; $p > 0,05$). Au vue de ce résultat, il semblerait que le consortium ne soit pas présent dans les sols inoculés. Cependant, un gramme de sol contient en moyenne 10^9 bactéries (Van-Camp *et al.*, 2004) et lors de l'inoculation, 10^7 cellules par gramme de sol ont été ajoutées. Ainsi, comme il y a déjà un grand nombre de microorganismes dans le sol, les cellules exogènes ont pu être masquées par cette abondance. Aussi, le nombre de copies de gène ne représente pas le nombre de bactéries car une à 15 copies peuvent être présentes dans le génome (Klappenbach *et al.*, 2001). De ce fait, les sols ne possèdent pas forcément le même nombre de microorganismes bactériens.

Après 3 jours d'exposition (T1), le polluant ne semble pas présenter de toxicité directe sur les bactéries car tous les échantillons possèdent un nombre de copies de gène significativement plus important qu'au début de l'exposition (T0, $p < 0,05$), mis à part pour l'échantillon TN avec consortium et champignon (Figure 64 C) où aucune évolution du nombre de copies n'est observée par rapport à T0 ($p > 0,05$). Quel que soit le type de sol, il n'y a pas de réelles différences entre les traitements ce qui indique que la microflore bactérienne n'a pas encore consommée les composés d'exsudats racinaires (E1, E2, MxG).

En effet, cela aurait induit une augmentation de sa croissance et donc probablement une augmentation du nombre de copies de gène par rapport au sol TN. Une durée de 3 jours apparaît comme insuffisante pour visualiser l'impact de la biostimulation (mélanges d'exsudats et MxG). En ce qui concerne la comparaison des différents types de bioaugmentation (sans consortium, avec consortium, avec consortium et champignon) en fonction des traitements (TN, E1, E2, MxG), seuls les sols plantés avec MxG présentent des différences significatives. L'échantillon sans consortium possède un nombre de copies de gène ARNr 16S significativement plus faible ($2,44.10^8 \pm 2,17.10^7$) que les sols qui ont été bioaugmentés que ce soit avec le consortium seul ($3,42.10^8 \pm 1,53.10^7$) ou avec le consortium et le champignon ($3,40.10^8 \pm 2,07.10^7$; $p < 0,05$). Ces résultats semblent indiquer que l'association de la plante et de la bioaugmentation permet de stimuler davantage la croissance bactérienne, révélant alors le synergisme entre MxG et les microorganismes. Ces derniers ont montré leurs capacités d'adaptation à l'environnement particulier qu'est la rhizosphère grâce notamment au fait qu'ils aient été isolés à partir de sol rhizosphérique provenant de MxG, prouvant l'avantage d'utiliser des souches microbiennes indigènes.

Après 15 jours d'exposition (T2), contrairement à T1, un effet toxique probable du BaA sur la microflore bactérienne est observé car l'abondance en gènes ARNr 16S a significativement diminué ($p < 0,05$) pour les sols TN non inoculé (Figure 64 A) et inoculé avec le consortium seul (Figure 64 B). L'absence de cet effet au prélèvement T1 pourrait par exemple s'expliquer par une non biodisponibilité du polluant. En revanche, la toxicité semble être masquée pour ces mêmes sols (sans consortium et avec consortium seul) qui ont été biostimulés (E1, E2, MxG ; Figure 64 A et B) car une augmentation significative du nombre de copies de gène a été obtenue par rapport à T0 et T1 ($p < 0,05$) en raison, probablement, d'une stimulation de la croissance bactérienne grâce à la présence des nutriments. Seul l'échantillon sans consortium présentant le mélange E2 (Figure 64 A) possède une densité de gènes ARNr 16S significativement plus faible qu'à T1 ($8,25.10^7 \pm 3,20.10^7$ contre $2,52.10^8 \pm 1,97.10^7$; $p < 0,05$), ce qui semble traduire un impact négatif de l'acide gallique sur les espèces bactériennes. Les travaux de Técher (2011) ont en effet suggéré un effet bactériostatique de ce composé. D'autres études ont également montré l'effet inhibiteur de l'acide gallique sur la croissance bactérienne (Díaz-Gómez *et al.*, 2014; Shao *et al.*, 2015). L'absence de cette inhibition au prélèvement T1 pourrait provenir d'une non biodisponibilité du composé car

l'étude de Percuoco et Formisano (1982) a montré qu'il pouvait former des complexes dans le sol ce qui diminuait sa disponibilité aux microorganismes. Aussi, l'absence d'inhibition pour le sol inoculé avec le consortium seul (Figure 64 B) montre que les microorganismes qui le composent possèdent certainement une résistance envers l'acide gallique et/ou des capacités de dégradation, le composé devenant alors non biodisponible pour impacter négativement les espèces bactériennes. En ce qui concerne les sols en présence de l'association consortium et champignon (Figure 64 C), les résultats obtenus avec les différentes modalités (TN, E1, E2, MxG) s'avèrent fortement différents des autres types de sol (sans consortium et avec consortium). En effet, une augmentation significative du nombre de copies de gène ARNr 16S a été observée dans le sol TN par rapport à T1 ($4,51.10^8 \pm 1,96.10^7$ contre $1,86.10^8 \pm 7,27.10^7$; $p < 0,05$) et aucune évolution de la quantité de gènes n'a été obtenue par rapport à T1 pour les autres traitements ($p > 0,05$; E1, E2, MxG). Ces résultats traduisent un effet positif de l'espèce fongique envers le BaA *via* probablement une dégradation de celui-ci et/ou une diminution de sa biodisponibilité par sorption du polluant au champignon par exemple (Verdine *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2003). Cependant, en présence d'une abondance de nutriments (E1, E2, MxG), la non évolution du nombre de copies de gène semble traduire un effet inhibiteur de l'espèce fongique sur la croissance des bactéries en raison, probablement, d'une compétition pour les nutriments. Aussi, celle-ci a pu conduire les espèces fongiques à produire des substances antibactériennes. Une étude menée sur un sol contaminé par des produits pétroliers a par exemple montré que des champignons issus de ce sol produisaient des agents antimicrobiens envers les bactéries indigènes capables de dégrader les hydrocarbures (Ogbonna *et al.*, 2013). Ce résultat a été expliqué, par les auteurs, par une compétition entre les microorganismes dégradants pour les ressources nutritives. Lorsque les différents traitements sont comparés (TN, E1, E2, MxG), la présence de MxG induit une densité de gènes significativement plus forte ($p < 0,05$) par rapport aux autres échantillons pour les sols sans consortium et avec consortium seul (Figure 64 A et B), ce qui montre que la plante semble stimuler davantage la croissance bactérienne en raison de ses différents rhizodépôts. En revanche, aucune différence réelle entre les traitements n'a été observée pour les sols inoculés avec le consortium et le champignon (Figure 64 C) ce qui confirme l'impact inhibiteur de ce dernier sur la croissance bactérienne. En ce qui concerne la comparaison des différents types de bioaugmentation (sans consortium, avec consortium, avec consortium et champignon), un nombre de copies

de gène ARNr 16S significativement plus élevé a été obtenu avec l'échantillon TN inoculé avec le consortium et le champignon ($4,51.10^8 \pm 1,96.10^7$) par rapport aux sols TN non inoculé ($1,86.10^8 \pm 6,27.10^7$) et en présence du consortium seul ($2,46.10^8 \pm 3,44.10^7$; $p < 0,05$) ce qui semble confirmer l'effet positif du champignon sur le BaA (dégradation et/ou diminution de sa biodisponibilité). Pour les autres traitements (E1, E2, MxG), les sols qui possèdent le consortium seul présentent toujours une densité de gènes significativement plus importante que ceux inoculés avec le consortium et le champignon ($p < 0,05$) ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle l'espèce fongique présenterait un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries.

A la fin de l'expérimentation (T3, 105 jours), une forte augmentation de la densité de gènes ARNr 16S significativement différente des autres prélèvements (T0, T1 et T2, $p < 0,05$) est observée pour tous les types de sol. Ce résultat traduit soit l'adaptation au cours du temps de la microflore bactérienne à la présence du polluant, soit la dégradation ou la séquestration du composé dans le sol, celui-ci devenant alors non biodisponible pour affecter les microorganismes. Aussi, cela traduit une adaptation des bactéries à la présence du champignon pour les sols inoculés avec le consortium et l'espèce fongique, mais également l'adaptation des microorganismes bactériens à la présence de l'acide gallique pour l'échantillon E2 sans consortium. L'acide gallique a également pu être dégradé ou complexé dans le sol au cours du temps. Pour les sols sans consortium et inoculés avec le consortium et le champignon (Figure 64 A et C), une densité de gènes significativement plus faible ($p < 0,05$) a été obtenue pour le mélange E1 par rapport aux autres traitements (TN, E2 et MxG) alors qu'aucune différence entre les traitements n'est réellement observée pour les échantillons avec consortium seul (Figure 64 B). Ceci semble indiquer qu'un ou des composés du mélange E1 (quercétine, apigénine et catéchine) soient devenus légèrement bactériostatiques au cours du temps et que la présence d'acide gallique annule cette action puisqu'aucun effet n'a été observé pour le mélange E2. Effectivement, Técher (2011) a pu observer un effet bactériostatique de l'apigénine qui variait en fonction des cultures bactériennes et de la présence des autres molécules (quercétine, catéchine et acide gallique). En ce qui concerne la comparaison des différents types de bioaugmentation (sans consortium, avec consortium, avec consortium et champignon), une quantité de gènes ARNr 16S significativement plus élevée a été obtenue pour les échantillons inoculés avec le

consortium seul par rapport à ceux sans consortium et inoculé avec le consortium et le champignon pour les sols TN et E1 ($p < 0,05$). Ce résultat montre que la présence du consortium stimule davantage la croissance bactérienne et que la souche fongique présente probablement toujours un effet inhibiteur sur celle-ci. En revanche, aucune différence significative n'a été détectée entre les différents types de bioaugmentation pour les sols E2 et MxG ($p > 0,05$) ce qui semble traduire que la biostimulation à elle seule suffit pour stimuler la croissance des communautés bactériennes et que cet effet masque la stimulation provenant de la bioaugmentation.

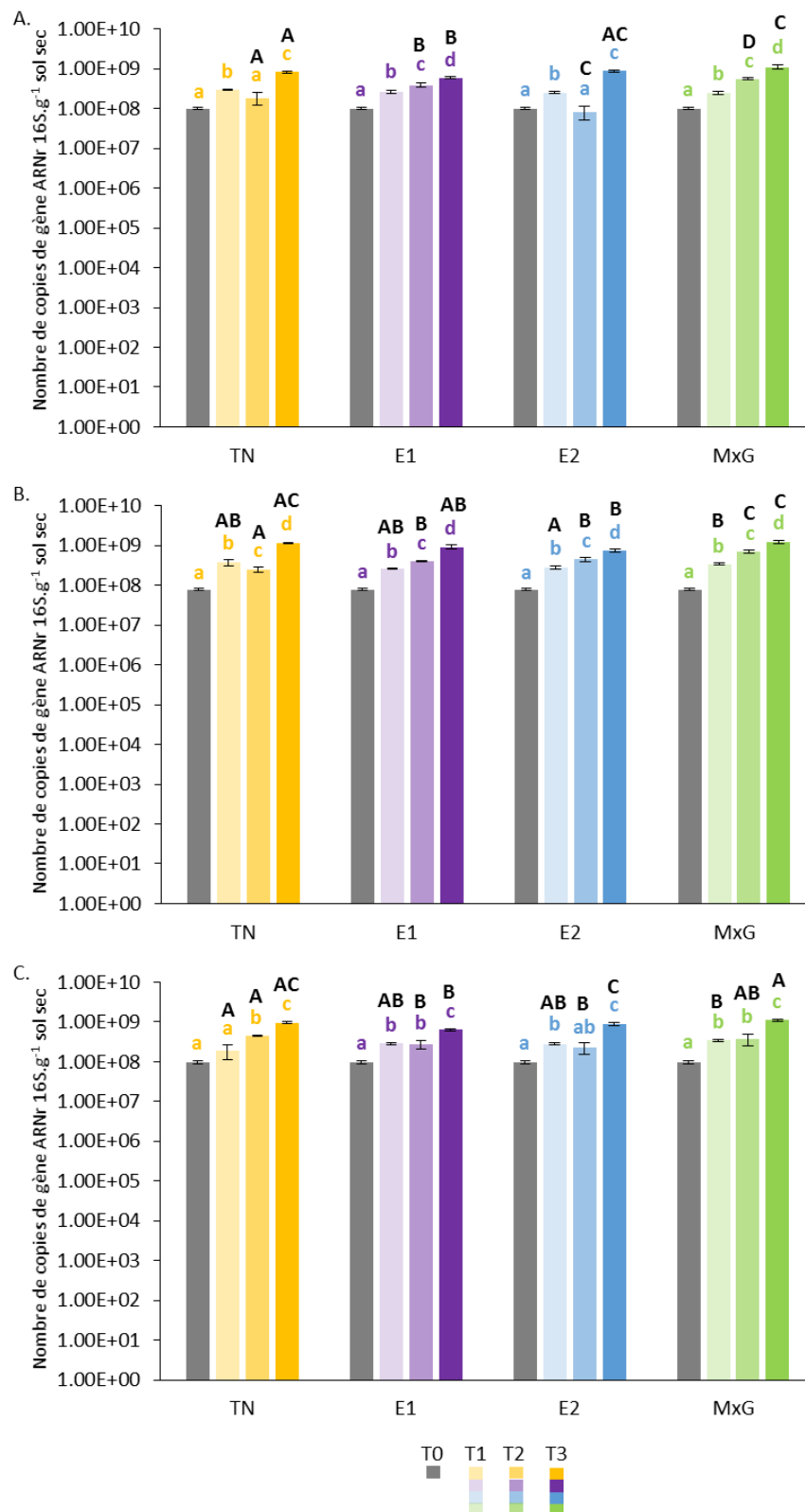


Figure 64. Nombre de gènes ARNr 16S (moyenne $\pm$ écart type, $n=6$) présents dans les sols contaminés sans consortium (A), avec consortium (B) et avec consortium plus champignon (C) au cours du temps (de T0 à T3) en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence de traitement (TN). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T1, T2 et T3 pour chaque traitement (orange : TN, violettes : E1, bleues : E2, vertes : MxG, $p < 0,05$). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre chaque traitement à chaque temps de prélèvement T1, T2 et T3 ($p < 0,05$).

D'une manière générale, la quantité de gènes ARNr 16S a augmenté au cours du temps pour tous les échantillons. La biostimulation réalisée à l'aide de MxG présente, généralement, une stimulation plus importante de la densité de gènes par rapport aux mélanges d'exsudats (E1 et E2), notamment en fin d'exposition (T3). En ce qui concerne la bioaugmentation, c'est l'inoculation du consortium seul qui permet, de façon générale, d'obtenir une plus grande quantité de gènes par rapport aux sols non inoculés. En effet, l'ajout du champignon présente un effet inhibiteur sur l'action positive du consortium en raison, probablement, d'un phénomène de compétition pour les nutriments. A la fin de l'expérimentation (T3), l'abondance en gènes ARNr 16S est davantage stimulée par la biostimulation, ce qui masque l'impact de la bioaugmentation.

3.2.2.2.2. Densité de gènes ARNr 18S

La densité de gènes ARNr 18S présente au cours du temps dans les sols des différentes modalités (sans consortium, avec consortium, avec consortium et champignon) en fonction des traitements qui leur ont été attribués (TN, E1, E2 et MxG) est présentée sur la figure 65.

Au début de l'expérimentation (T0), un nombre significativement plus important de gènes ARNr 18S a été obtenu dans le sol présentant le consortium et le champignon par rapport au sol inoculé avec le consortium seul ($p < 0,05$). Ceci peut être expliqué par l'ajout de la souche fongique, engendrant un apport de gènes plus important. Cependant, aucune différence significative n'a été détectée entre ceux deux échantillons et le sol non inoculé ($p > 0,05$). L'apport de la souche n'est peut être pas assez important pour être observé car un gramme de sol contient déjà en moyenne 10^6 champignons (Van-Camp *et al.*, 2004).

Au prélèvement T1, le nombre de copies de gène n'a pas évolué par rapport à T0 ($p > 0,05$) pour la plupart des sols ce qui semble signifier soit que la biostimulation n'est pas encore effective après 3 jours d'exposition en raison certainement d'un délai trop court, soit que ce procédé est inefficace. Seul l'échantillon TN avec consortium (Figure 65 B) présente une augmentation significative de la quantité de gènes par rapport à T0 ($5,04 \cdot 10^7 \pm 7,20 \cdot 10^6$ contre $2,52 \cdot 10^7 \pm 2,18 \cdot 10^6$; $p < 0,05$). La présence du consortium semble alors avoir stimuler la croissance fongique *via* par exemple l'émission de composés organiques volatils (Kai *et al.*, 2008; Vespermann *et al.*, 2007; Wheatley, 2002) afin qu'ils puissent contribuer également à

la dégradation du polluant. En revanche, la présence des exsudats (E1, E2 et MxG) dans le sol TN avec consortium (Figure 65 B) aurait entraîné une modification de la diversité fongique et/ou un phénomène de compétition entre les microorganismes pour les nutriments, causant l'élimination de certaines espèces. Au contraire, lorsque le champignon est inoculé avec le consortium (Figure 65 C), une diminution du nombre de gènes ARNr 18S est observée dans les sols TN ($1,49.10^7 \pm 5,89.10^6$) et E1 ($2,42.10^7 \pm 2,26.10^6$) par rapport à T0 ($3,39.10^7 \pm 3,67.10^6$; $p < 0,05$). Cependant, il n'y a aucune différence significative entre les traitements ($p > 0,05$), ce qui signifie que la présence du champignon a causé un phénomène de compétition encore plus important pour les nutriments, même en absence de biostimulation (TN). Cette hypothèse est confortée par les différentes significatives observées entre les sols TN sans consortium, avec consortium et avec consortium et champignon. En effet, une densité de gènes significativement plus faible a été obtenue pour le sol inoculé avec le consortium et le champignon ($1,49.10^7 \pm 5,89.10^6$), suivi du sol non inoculé ($2,61.10^7 \pm 1,40.10^6$), puis du sol avec consortium seul ($5,04.10^7 \pm 7,20.10^6$; $p < 0,05$). En ce qui concerne les autres traitements (E1, E2 et MxG), aucune différence significative n'a été déterminée entre les différents types de bioaugmentation ($p > 0,05$). De ce fait, après 3 jours d'exposition, la bioaugmentation ne semble pas affecter la croissance fongique lorsqu'elle est associée à la biostimulation, les nutriments permettant certainement une stimulation plus importante de la croissance ce qui masque son effet.

Après 15 jours d'exposition (T2), une diminution significative de la densité de gènes ARNr 18S est mesurée dans la majorité des sols par rapport à T1 ($p < 0,05$) ce qui semble traduire un impact toxique du BaA envers la microflore fongique. Cette toxicité est cependant moins importante en présence du mélange E1 et de la plante pour les sols non inoculés (Figure 65 A), probablement grâce à une stimulation de champignons dégradants. L'association de l'acide gallique aux autres composés (quercétine, apigénine et catéchine) semble alors empêcher leur impact positif puisqu'en présence du mélange E2, la toxicité est similaire à celle du sol TN ($p > 0,05$). L'acide gallique peut en effet, inhiber la croissance de nombreux champignons des sols (Dix, 1979). Quant aux autres échantillons (E1 avec consortium, TN avec consortium et champignon, E1 avec consortium et champignon), aucune évolution de l'abondance en gènes ARNr 18S n'a été observée par rapport à T1 ($p > 0,05$). Les valeurs obtenues ne sont cependant pas réellement différentes de celles des autres traitements.

Ainsi, même en présence du consortium bactérien, le BaA entraîne un effet toxique sur les espèces fongiques. Ceci signifie que les microorganismes du consortium n'ont peut être pas encore dégradé le polluant mais qu'ils présentent tout de même un effet positif sur les champignons *via* une stimulation de leur croissance (puisque'il n'y a aucune réelle différence entre les traitements). Pour les sols avec le consortium et le champignon (Figure 65 C), comme les résultats sont similaires à ceux des sols avec consortium seul (Figure 65 B), cela signifie que la présence du champignon ne semble pas influencer la croissance fongique totale. Les échantillons sans consortium TN et E2 présentent une densité de gènes ARNr 18S significativement plus faible par rapport aux échantillons inoculés que ce soit avec le consortium seul ou avec le consortium et le champignon ($p < 0,05$). Ce résultat traduit un effet positif probable de la bioaugmentation et notamment de son association avec la biostimulation du mélange E2 sur la croissance fongique. L'absence de l'effet de la bioaugmentation avec le mélange E1 signifie qu'il n'y a pas de synergisme entre les deux. Aussi, l'absence de différences entre les deux types de bioaugmentation (avec consortium, avec consortium et champignon) pour les sols sans consortium TN et E2 ($p > 0,05$), conforte l'hypothèse selon laquelle l'inoculation du champignon ne présente pas d'effet sur les communautés fongiques totales. Le sol planté avec MxG inoculé avec le consortium et le champignon présente toutefois une abondance en gènes significativement plus faible que celle du sol inoculé avec le consortium seul ($6,51 \cdot 10^6 \pm 2,51 \cdot 10^6$ contre $1,50 \cdot 10^7 \pm 1,68 \cdot 10^6$; $p < 0,05$), mais il n'y a pas de différence significative entre l'échantillon non inoculé et les échantillons inoculés ($p > 0,05$).

A la fin de l'exposition (T3), le nombre de gènes ARNr 18S a significativement diminué pour la plupart des sols par rapport à T2 ($p < 0,05$) ou n'a pas évolué ($p > 0,05$), ce qui signifie que le BaA présente toujours une toxicité envers les champignons. Seul l'échantillon E2 sans consortium présente un nombre de gènes significativement plus élevé qu'à T2 ($7,64 \cdot 10^6 \pm 3,86 \cdot 10^5$ contre $3,14 \cdot 10^6 \pm 1,21 \cdot 10^6$; $p < 0,05$) mais la valeur reste toujours significativement plus faible que T0 et T1 ($p < 0,05$) et aucune différence significative n'a réellement été observée entre les différents traitements des sols non inoculés (TN, E1, E2, MxG). L'effet inhibiteur de l'acide gallique semble alors s'être dissipé au cours du temps puisque'il n'y a pas de diminution significative de la quantité de gènes dans le sol E2 sans consortium. Aussi, la biostimulation seule (non associée à la bioaugmentation), ne permet pas de remédier au

problème de toxicité du BaA. En revanche, la bioaugmentation seule (non associée à la biostimulation) avec le consortium bactérien (sol TN avec consortium, $9,28.10^6 \pm 1,07.10^6$), permet d'obtenir un nombre de gènes ARNr 18S significativement plus élevé que les sols non inoculé ($6,13.10^6 \pm 8,05.10^5$) ou inoculé avec le consortium et le champignon ($4,26.10^6 \pm 4,20.10^5$; $p < 0,05$), ce qui traduit un éventuel effet positif du consortium sur la croissance fongique et confirme l'absence d'influence du champignon inoculé. Lorsque la bioaugmentation est associée à la biostimulation, les sols E2 et MxG avec consortium ($5,07.10^6 \pm 4,25.10^5$ et $4,13.10^6 \pm 8,64.10^5$, respectivement; Figure 65 B), présentent une diminution significativement plus importante de la densité de gènes par rapport aux autres traitements (TN : $9,28.10^6 \pm 1,07.10^6$ et E1 : $9,07.10^6 \pm 1,39.10^6$; $p < 0,05$). Ceci pourrait alors s'expliquer par une plus forte toxicité due à la présence de métabolites de dégradation du BaA puisque le métabolisme du composé BaA-3,4-dihydrodiol s'est montré 10 fois plus mutagène envers la bactérie *Salmonella typhimurium* TA 100 que la molécule initiale (Wood *et al.*, 1976, 1977b). De ce fait, une dégradation plus importante du contaminant dans les sols E2 et MxG expliquerait leur plus forte toxicité. Les composés de ces exsudats (E2 et MxG) et notamment l'acide gallique seraient alors impliqués dans la stimulation des microorganismes dégradants et/ou dans la dégradation co-métabolique du contaminant. Aussi, l'association de la bioaugmentation (avec consortium, et avec consortium et champignon) et du mélange E2, conduit à un nombre de gènes ARNr 18S significativement plus faible (E2 avec consortium : $5,07.10^6 \pm 4,25.10^5$; E2 avec consortium et champignon : $5,45.10^6 \pm 6,25.10^5$) que le sol E2 non inoculé ($7,64.10^6 \pm 3,86.10^5$; $p < 0,05$), ce qui confirme que cette association permet probablement une meilleure dégradation du polluant. Contrairement aux sols inoculés avec le consortium seul où les résultats sont contrastés selon les traitements, les échantillons inoculés avec le consortium et le champignon ne présentent pas de réelles différences entre eux (TN, E1, E2 et MxG). Ceci confirmerait l'implication de la souche fongique dans la dégradation du BaA, et notamment dans celle de ses métabolites secondaires produits probablement *via* l'action du consortium bactérien. La métabolisation des intermédiaires de dégradation du BaA conduirait alors à une toxicité réduite.

Le tableau 32 présente le pourcentage de gènes ARNr 18S mesuré par rapport aux gènes ARNr 16S dans les sols au cours du temps. Quel que soit l'échantillon, le pourcentage de

gènes a significativement diminué par rapport à T0 dès 3 jours d'exposition (T1, $p < 0,05$). Celui-ci s'est ensuite maintenu de façon générale pour tous les sols entre les prélèvements T1 et T2. A la fin de l'exposition (T3), tous les échantillons présentent un pourcentage de gènes ARNr 18S significativement plus faible que T0 ($p < 0,05$). En revanche, aucune différence n'a été détectée entre les traitements (TN, E1, E2 et MxG) que ce soit pour les sols sans consortium (SC, $p > 0,05$), avec consortium (C, $p > 0,05$) ou avec consortium et champignon (C+CH, $p > 0,05$). Aucune différence significative n'a également été révélée entre les différents types de bioaugmentation (SC, C et C+CH) pour tous les traitements ($p > 0,05$). Ainsi, la biostimulation (E1, E2 et MxG) et la bioaugmentation (C et C+CH) n'ont pas influencé la croissance des champignons, seul le temps a impacté leur développement. Ceci confirme la toxicité du BaA au cours du temps envers la microflore fongique, favorisant alors le développement des bactéries.

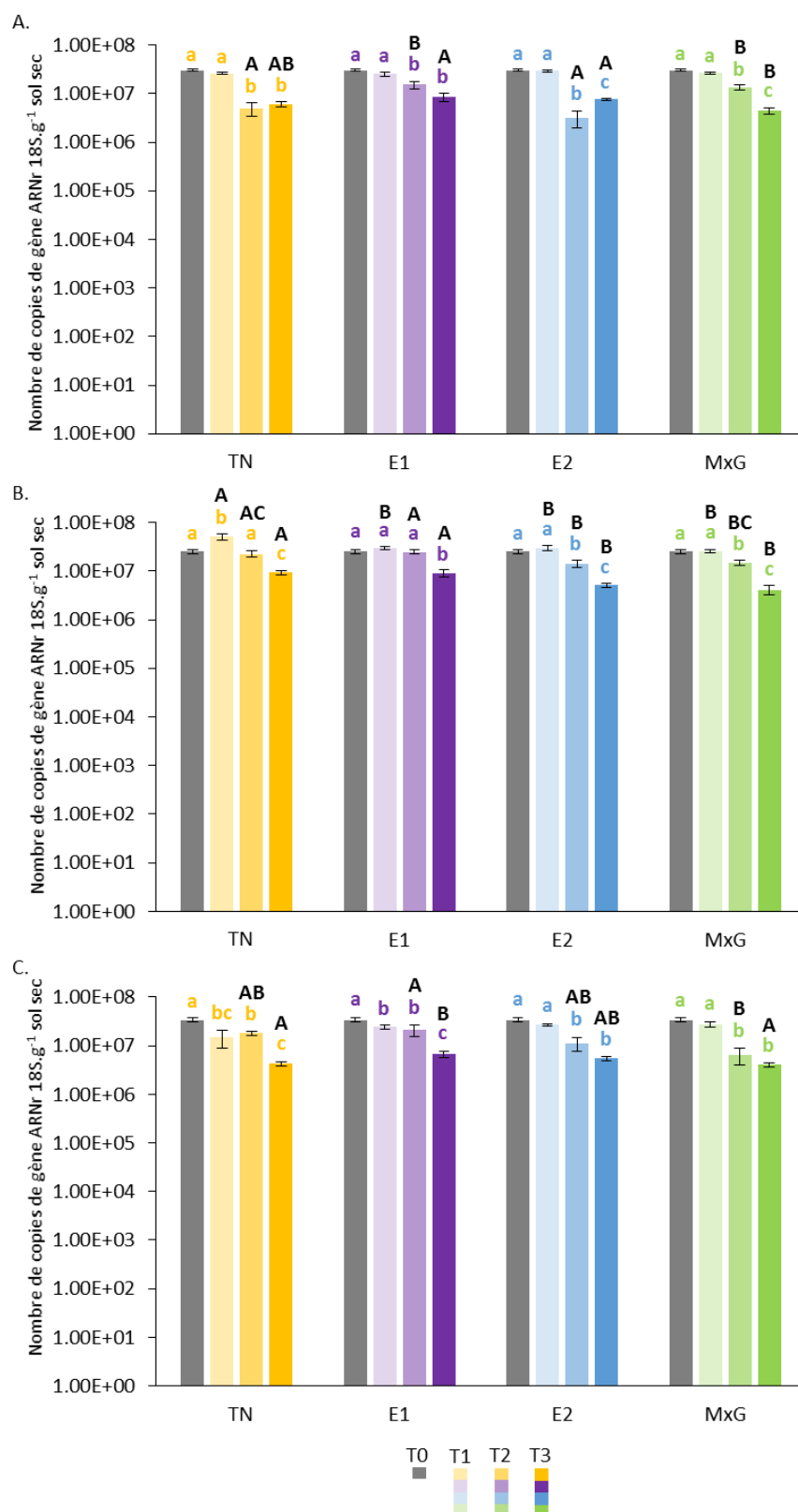


Figure 65. Nombre de gènes ARNr 18S (moyenne $\pm$ écart type, $n=6$) présents dans les sols contaminés sans consortium (A), avec consortium (B) et avec consortium plus champignon (C) au cours du temps (de T0 à T3) en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence de traitement (TN). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T1, T2 et T3 pour chaque traitement (orange : TN, violettes : E1, bleues : E2, vertes : MxG, $p < 0,05$). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre chaque traitement à chaque temps de prélèvement T1, T2 et T3 ($p < 0,05$).

Tableau 32. Pourcentage de gènes ARNr 18S par rapport aux gènes ARNr 16S (moyenne $\pm$ écart type, n=6) au cours du temps (de T0 à T3) dans les sols contaminés sans consortium (SC), avec consortium (C) et avec consortium plus champignon (C + CH) en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence de traitement (TN). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T1, T2 et T3 pour chaque traitement (orange : TN, violettes : E1, bleues : E2, vertes : MxG, $p < 0,05$).

	SC				C				C + CH			
	TN	E1	E2	MxG	TN	E1	E2	MxG	TN	E1	E2	MxG
T0	30,19 $\pm$ 1,18 a	30,19 $\pm$ 1,18 a	30,19 $\pm$ 1,18 a	30,19 $\pm$ 1,18 a	31,89 $\pm$ 1,66 a	31,89 $\pm$ 1,66 a	31,89 $\pm$ 1,66 a	31,89 $\pm$ 1,66 a	34,27 $\pm$ 2,19 a	34,27 $\pm$ 2,19 a	34,27 $\pm$ 2,19 a	34,27 $\pm$ 2,19 a
T1	8,93 $\pm$ 0,69 b	9,62 $\pm$ 0,67 b	11,75 $\pm$ 0,75 b	11,22 $\pm$ 1,21 b	13,82 $\pm$ 0,89 b	11,10 $\pm$ 0,59 b	10,27 $\pm$ 0,98 b	7,54 $\pm$ 0,72 b	5,52 $\pm$ 2,19 b	8,52 $\pm$ 0,31 b	9,69 $\pm$ 0,80 b	8,14 $\pm$ 0,95 b
T2	2,76 $\pm$ 0,16 bc	3,87 $\pm$ 0,41 bc	3,82 $\pm$ 0,21 bc	2,43 $\pm$ 0,26 c	9,17 $\pm$ 0,67 b	6,12 $\pm$ 0,50 bc	3,11 $\pm$ 0,26 bc	2,13 $\pm$ 0,20 bc	3,95 $\pm$ 0,32 b	7,61 $\pm$ 0,78 b	4,98 $\pm$ 0,62 bc	1,72 $\pm$ 0,17 bc
T3	0,73 $\pm$ 0,07 c	1,42 $\pm$ 0,25 c	0,90 $\pm$ 0,11 c	0,42 $\pm$ 0,05 c	0,81 $\pm$ 0,09 c	0,98 $\pm$ 0,07 c	0,68 $\pm$ 0,08 c	0,33 $\pm$ 0,05 c	0,45 $\pm$ 0,04 b	1,06 $\pm$ 0,12 c	0,62 $\pm$ 0,07 c	0,37 $\pm$ 0,05 c

De façon générale, la quantité de gènes ARNr 18S a diminué au cours du temps pour tous les échantillons, suggérant un effet toxique du BaA et de ses éventuels métabolites de dégradation sur les communautés fongiques. La biostimulation réalisée avec le mélange d'exsudats E1 permet d'obtenir, généralement, un nombre de copies de gène ARNr 18S plus important que MxG, notamment en fin d'exposition (T3). Pour la bioaugmentation, l'inoculation avec le consortium seul conduit, de manière générale, à une stimulation plus importante de la quantité de gènes par rapport aux sols non inoculés. Quant à l'ajout du champignon, celui-ci ne semble pas influencer la densité de gènes. En fin d'exposition (T3), l'effet de la bioaugmentation est masqué par la biostimulation, qui stimule, certainement, davantage l'abondance en gènes ARNr 18S. Cependant, si la diminution du nombre de copies est due à la présence de métabolites de dégradation du BaA, MxG conduirait à une dégradation plus importante du composé puisqu'une plus faible quantité de gènes a été mesurée dans ces sols à T3.

3.2.2.2.3. Densité de gènes PAH-RHD_α GP

Le nombre de copies de gène PAH-RHD_α GP présent au cours du temps dans les sols des différentes modalités (sans consortium, avec consortium, avec consortium et champignon) en fonction des traitements qui leurs ont été attribués (TN, E1, E2 et MxG) est présenté sur la figure 66.

Au début de l'expérimentation (T0), aucune différence significative n'a été décelée entre les différents types de bioaugmentation (sans consortium, avec consortium, avec consortium et champignon ; $p > 0,05$). Pour les sols inoculés, une augmentation du nombre de copies de gène PAH-RHD_α GP aurait pu être attendue en raison de l'ajout du consortium. Ce résultat semble alors indiquer que les microorganismes qui le composent ne possèdent pas ou peu le gène, leur présence dans le sol n'étant alors pas détectable.

Au prélèvement T1, une baisse significative de la densité de gènes est observée par rapport à T0 pour tous les sols qui n'ont pas été bioaugmentés ($p < 0,05$, Figure 66 A). Le BaA semble alors montrer une toxicité dès 3 jours d'exposition envers les bactéries à Gram positif dégradantes qui sont initialement présentes dans la tourbe composant le sol. Bien qu'elles possèdent un gène de dégradation des HAP, celui-ci n'est peut être pas encore exprimé. De

plus, puisque le gène PAH-RHD α code pour des dioxygénases, d'autres enzymes pourraient être impliquées dans la dégradation initiale du BaA telles que les monooxygénases. La biostimulation seule (non associée à la bioaugmentation) ne semble alors pas promouvoir le développement de ces communautés bactériennes à 3 jours d'exposition. Seul le mélange E2 (sans consortium) montre un éventuel impact positif car le sol présente une diminution significativement moins importante de la densité de gènes par rapport aux autres traitements ($2,09.10^5 \pm 1,42.10^4$ contre $1,37.10^5 \pm 1,00.10^4$ pour TN, $1,31.10^5 \pm 8,66.10^3$ pour E1, et $1,37.10^5 \pm 1,58.10^4$ pour MxG ; $p < 0,05$). Ceci peut s'expliquer par une stimulation des microorganismes dégradants grâce notamment à l'acide gallique, engendrant alors une toxicité un peu moins importante. L'influence de cette molécule peut en effet varier (effet promoteur ou inhibiteur) selon les microorganismes et la présence d'autres molécules, comme cela a été montré dans l'étude de Técher (2011). En revanche, lorsque la bioaugmentation et la biostimulation sont associées (Figures 66 B et C), une augmentation significative de la quantité de gènes PAH-RHD α GP est observée dans la majorité des sols par rapport à T0 ($p < 0,05$). L'éventuelle toxicité du BaA semble alors s'être dissipée en présence du consortium bactérien. Celui-ci a pu par exemple dégrader le composé et/ou modifier sa mobilité, le rendant alors non biodisponible aux bactéries indigènes qui apparaissent comme étant non résistantes à la toxicité du BaA (Figure 66 A). En effet, les microorganismes peuvent produire des surfactants qui vont améliorer la biodisponibilité des polluants (Barkay *et al.*, 1999; Gu and Chang, 2001; Zhang *et al.*, 1997) mais ces derniers peuvent se retrouver piégés dans les micelles des surfactants (Barkay *et al.*, 1999; Grimberg *et al.*, 1996; Guha and Jaffé, 1996; Volkering *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997; Zhang and Miller, 1992), ce qui réduit finalement leur biodisponibilité. L'augmentation du nombre de copies de gène proviendrait alors de la croissance des bactéries indigènes mais également de celles qui composent le consortium, indiquant que certaines espèces possèdent le gène PAH-RHD α GP. Ce dernier pourrait alors éventuellement être impliqué dans la dégradation du BaA. Aussi, comme de nombreux gènes impliqués dans la dégradation des HAP sont localisés dans des plasmides (Johnsen *et al.*, 2005), l'augmentation de la densité peut provenir du transfert de gène. Lorsque le champignon est associé au consortium, celui-ci semble toutefois réduire l'influence positive de ce dernier car la densité de gènes n'a pas significativement augmenté pour tous les sols. En effet, celle des échantillons TN et E2 inoculés avec le consortium et le champignon n'a pas évolué par rapport à T0 ($p > 0,05$, Figure 66 C), et il n'y a pas de réelles

différences entre les traitements. La souche fongique a pu par exemple inhiber la croissance des microorganismes *via* une compétition pour les nutriments, la conduisant à libérer des substances antibactériennes (Ogbonna *et al.*, 2013). Ce phénomène aurait alors induit également une baisse de la dégradation du BaA et/ou une augmentation de sa biodisponibilité, conduisant à une certaine toxicité due au contaminant. L'impact positif de la bioaugmentation et notamment du consortium seul sur la toxicité du BaA est confirmé par une abondance en gènes PAH-RHD α GP significativement plus faible dans le sol non inoculé par rapport au sol inoculé avec le consortium pour les échantillons TN ($1,37.10^5 \pm 1,00.10^4$ contre $9,23.10^5 \pm 2,92.10^5$; $p < 0,05$), et par une quantité significativement plus faible dans le sol non inoculé par rapport aux deux autres sols bioaugmentés (avec consortium, avec consortium et champignon) pour les échantillons E1, E2 et MxG ($p < 0,05$). Le procédé de biostimulation quant à lui, ne semble pas ou peu impacter les communautés bactériennes dégradantes que ce soit au niveau de leur croissance ou de la dissipation du BaA en raison de l'absence de différence significative entre les traitements pour les sols inoculés avec le consortium ($p > 0,05$, Figure 66 B) et de l'absence réelle de différences pour les sols inoculés avec le consortium et le champignon (Figure 66 C). Bien que le mélange E2 semble présenter un léger effet positif lorsque le sol n'est pas inoculé (Figure 66 A), celui-ci est masqué dans les sols bioaugmentés en raison d'un plus fort impact de la bioaugmentation.

Après 15 jours d'exposition (T2), la quantité de gènes PAH-RHD α GP n'a pas évolué par rapport à T1 pour la majorité des sols ($p > 0,05$), ce qui indique que la toxicité du BaA est toujours présente. De plus, l'abondance en gènes a continué de diminuer pour les échantillons non inoculés TN et E2 (Figure 66 A), avec une quantité significativement plus faible par rapport aux sols E1 et MxG ($p < 0,05$). L'impact de l'acide gallique à T1 n'était finalement pas assez important pour maintenir une croissance suffisante des microorganismes. Seul l'échantillon non inoculé avec MxG présente une augmentation significative du nombre de copies de gène par rapport à T1 ($1,85.10^5 \pm 2,72.10^4$ contre $1,37.10^5 \pm 1,58.10^4$; $p < 0,05$) mais elle reste cependant significativement moins élevée qu'à T0 dont la valeur était de $3,14.10^5 \pm 1,96.10^4$ ($p < 0,05$). En absence de bioaugmentation, les traitements E1 et MxG, et notamment la plante, semblent alors présenter une légère amélioration de la croissance des bactéries à Gram positif dégradantes en raison peut être d'un impact sur le BaA (dégradation, modification de sa biodisponibilité). L'échantillon E2 du

sol inoculé avec le consortium (Figure 66 B) présente également une augmentation de la densité de gènes par rapport à T1 ($1,19.10^6 \pm 1,86.10^5$ contre $8,83.10^5 \pm 9,63.10^4$; $p < 0,05$) mais il n'y a pas de réelle différence entre les traitements. Malgré la stabilisation du nombre de copies de gène PAH-RHD $_{\alpha}$ GP en raison probablement de la toxicité du BaA, le procédé de bioaugmentation (notamment le consortium) montre toujours un impact positif. En effet, tous les sols non inoculés (TN, E1, E2 et MxG), présentent une quantité de gènes significativement plus faible que les sols qui ont été bioaugmentés avec le consortium et avec le consortium et le champignon ($p < 0,05$).

A la fin de l'exposition (T3), une forte augmentation significativement différente de tous les autres prélèvements a été obtenue pour tous les sols ($p < 0,05$). Ces résultats signifient que la microflore bactérienne dégradante possédant le gène PAH-RHD $_{\alpha}$ GP s'est adaptée au cours du temps *via* probablement l'expression de ce gène et donc la métabolisation du BaA. Aussi, du au processus de vieillissement de la contamination, la biodisponibilité du polluant a pu diminuer au cours du temps (Bogan and Sullivan, 2003; Ma *et al.*, 2012a; Nam *et al.*, 1998), celui-ci devenant alors inaccessible pour impacter les microorganismes. La biostimulation à l'aide de MxG montre un impact encore plus positif puisque la densité de gènes mesurée dans tous les sols plantés est significativement plus importante que pour ceux présentant les autres traitements ($p < 0,05$). Ceci est du à l'environnement particulier créé par les racines dans le sol et notamment grâce aux nombreux rhizodépôts qu'elles libèrent. En ce qui concerne la bioaugmentation, celle-ci conduit à une abondance de gènes PAH-RHD $_{\alpha}$ GP significativement plus importante dans le sol TN inoculé avec le consortium seul par rapport au sol inoculé avec le consortium et le champignon ($p < 0,05$), et dans le sol E1 inoculé avec le consortium seul par rapport aux sols non inoculé et inoculé avec le consortium et le champignon ($p < 0,05$). Ces résultats montrent que l'ajout du consortium seul impact toujours positivement les communautés bactériennes. Cependant, après 105 jours d'exposition, la biostimulation à l'aide de MxG semble avoir pris le dessus.

Le tableau 33 présente le pourcentage de gènes PAH-RHD $_{\alpha}$ GP mesuré par rapport aux gènes ARNr 16S dans les sols au cours du temps. Quel que soit l'échantillon, les valeurs de pourcentage obtenues sont très faibles (de $0,03 \pm 0,004$ % à $1,10 \pm 0,12$ %) ce qui signifie que les bactéries à Gram positif dégradantes possédant le gène PAH-RHD $_{\alpha}$ GP sont

minoritaires par rapport à d'autres espèces bactériennes. Aucune différence significative n'a été détectée entre les temps de prélèvement (T0, T1, T2 et T3) au sein d'un même échantillon ($p > 0,05$) ainsi qu'entre les traitements (TN, E1, E2 et MxG) que ce soit pour les sols sans consortium (SC, $p > 0,05$), avec consortium (C, $p > 0,05$) ou avec consortium et champignon (C+CH, $p > 0,05$). Aucune différence significative n'a également été décelée entre les différents types de bioaugmentation (SC, C et C+CH), quel que soit le traitement ($p > 0,05$). Le nombre de gènes PAH-RHD $_{\alpha}$ GP a alors évolué de la même manière que le nombre de gènes ARNr 16S. Ce résultat suggère que la bioaugmentation et la biostimulation n'ont pas induit une stimulation sélective de ces espèces bactériennes.

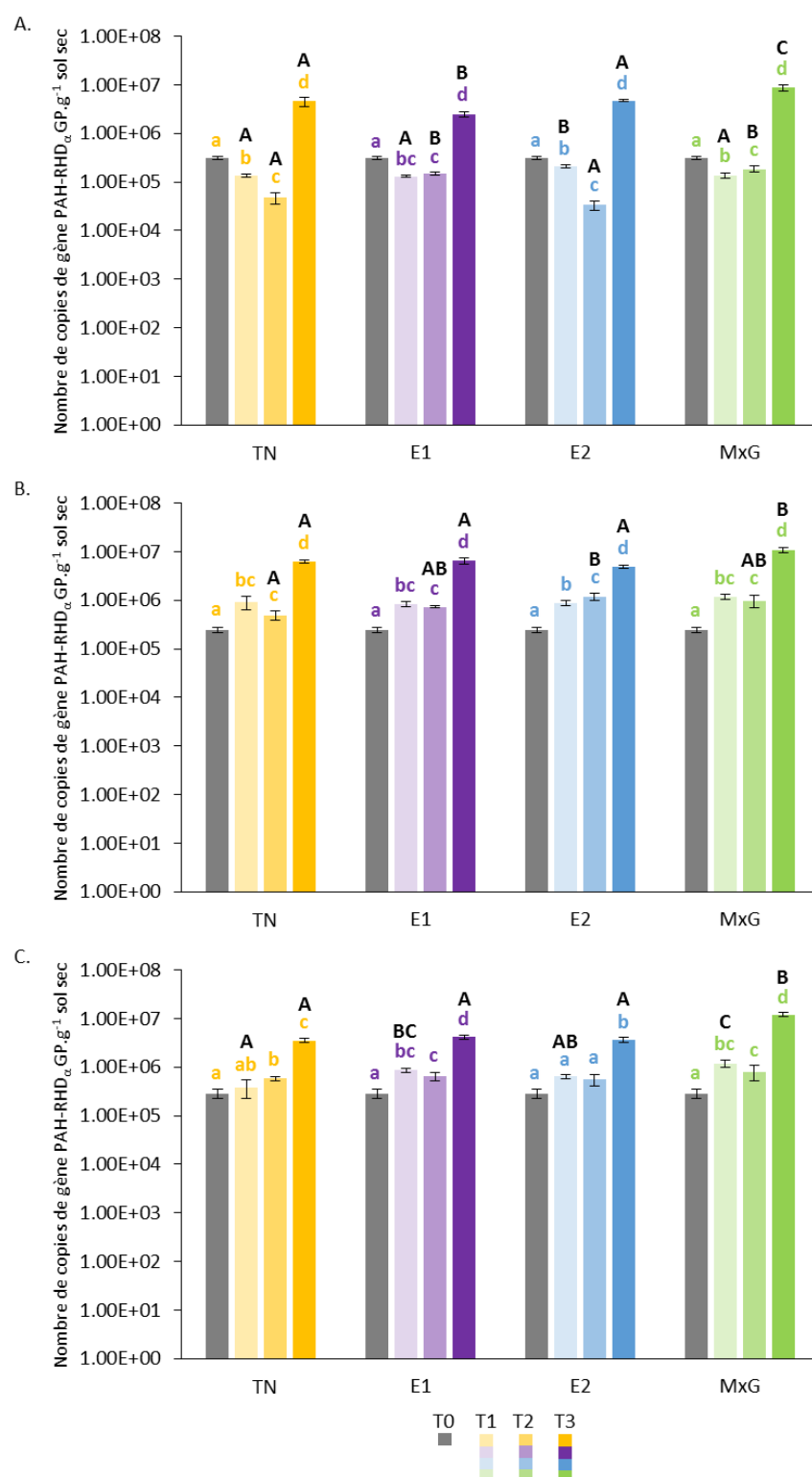


Figure 66. Nombre de gènes PAH-RHD α GP (moyenne $\pm$ écart type, n=6) présents dans les sols contaminés sans consortium (A), avec consortium (B) et avec consortium plus champignon (C) au cours du temps (de T0 à T3) en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence de traitement (TN). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T1, T2 et T3 pour chaque traitement (orange : TN, violettes : E1, bleues : E2, vertes : MxG, $p < 0,05$). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre chaque traitement à chaque temps de prélèvement T1, T2 et T3 ($p < 0,05$).

Tableau 33. Pourcentage de gènes PAH-RHD_α GP par rapport aux gènes ARNr 16S (moyenne ± écart type, n=6) au cours du temps (de T0 à T3) dans les sols contaminés sans consortium (SC), avec consortium (C) et avec consortium plus champignon (C + CH) en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence de traitement (TN).

	SC				C				C + CH			
	TN	E1	E2	MxG	TN	E1	E2	MxG	TN	E1	E2	MxG
T0	0,32 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,28 ± 0,03	0,28 ± 0,03	0,28 ± 0,03	0,28 ± 0,03
T1	0,05 ± 0,005	0,05 ± 0,002	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,23 ± 0,04	0,32 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,35 ± 0,06	0,14 ± 0,06	0,31 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,35 ± 0,05
T2	0,03 ± 0,004	0,04 ± 0,004	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,004	0,20 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,14 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,27 ± 0,03	0,22 ± 0,03
T3	0,55 ± 0,11	0,42 ± 0,05	0,56 ± 0,06	0,80 ± 0,03	0,55 ± 0,04	0,71 ± 0,04	0,67 ± 0,07	0,88 ± 0,12	0,38 ± 0,05	0,65 ± 0,05	0,42 ± 0,07	1,10 ± 0,12

Globalement, le nombre de gènes PAH-RHD α GP a augmenté au cours du temps pour tous les échantillons. En fin d'exposition (T3), la biostimulation réalisée avec MxG conduit à un nombre de gènes beaucoup plus important par rapport aux autres échantillons (TN, E1 et E2). En cours d'exposition, même si les sols bioaugmentés avec le consortium seul permettent, de façon générale, d'obtenir une plus grande quantité de gènes que les sols non inoculés, leurs effets sont masqués à T3 par l'influence davantage marquée de MxG. En ce qui concerne l'association du champignon au consortium bactérien, il semble présenter un effet inhibiteur sur l'action positive du consortium en raison, probablement, d'un phénomène de compétition pour les nutriments.

3.2.2.3. Conclusion

Bien qu'un effet du temps d'exposition soit clairement visible sur l'évolution de la diversité et de la densité microbienne, les deux procédés de remédiation des sols (biostimulation et bioaugmentation) impactent également la microflore tellurique. Lorsque le sol n'est pas inoculé, seule la biostimulation représentée par MxG influence la diversité bactérienne. En revanche, quand la bioaugmentation est appliquée, une modification plus importante de la structure des communautés est observée, avec un effet plus marqué des différents traitements de biostimulation. En effet, lorsque seul le consortium est inoculé, la diversité bactérienne du sol biostimulé avec le mélange d'exsudats E2 se rapproche le plus de celle du sol planté avec MxG. En revanche, lorsque le sol est bioaugmenté avec le consortium et le champignon, c'est le mélange E1 qui permet d'obtenir une diversité proche de celle du sol planté (MxG). Aussi, la présence de l'espèce fongique conduit à une modification encore plus importante de la structure des communautés bactériennes que lorsque le sol est inoculé avec le consortium seul. En ce qui concerne la densité microbienne, le nombre de copies de gène a évolué en moyenne de la même façon dans tous les sols, à savoir une augmentation de la quantité de gènes ARNr 16S et PAH-RHD α GP au cours du temps, et une diminution de la quantité de gènes ARNr 18S. De manière générale, les sols bioaugmentés avec le consortium seul ont permis d'obtenir une densité de gènes plus importante que les sols non inoculés, traduisant probablement une stimulation plus forte de la croissance des microorganismes. En revanche, lorsque la souche fongique *Fusarium oxysporum* est associée au consortium, celle-ci n'a pas vraiment d'influence sur

l'abondance en gènes, voire plutôt un effet inhibiteur sur l'action positive du consortium (notamment pour les gènes ARNr 16S et PAH-RHD α GP) *via* probablement un phénomène de compétition pour les nutriments. Pour ce qui est de la biostimulation, bien que des effets contrastés puissent parfois apparaître en cours d'exposition selon les traitements (TN, E1, E2 et MxG), un effet très positif de MxG est observé à la fin de l'expérimentation (105 jours) pour les gènes bactériens (ARNr 16S et PAH-RHD α GP) avec un nombre de copies plus important qu'avec les mélanges d'exsudats (E1 et E2). Après 105 jours d'exposition, la biostimulation avec MxG prend alors le dessus sur la bioaugmentation (pas d'effet de ce procédé). En revanche, pour le gène ARNr 18S, c'est le mélange d'exsudats E1 qui permet d'obtenir une plus forte densité de gènes à la fin de l'expérimentation, sans aucune influence de la bioaugmentation. Cependant, les résultats obtenus à partir de ce gène semblent révéler un éventuel impact négatif des métabolites de dégradation du BaA sur les communautés fongiques. Une plus faible abondance en gènes signifierait alors une meilleure dégradation du composé. Si tel est le cas, MxG apparaît comme étant responsable d'une plus forte métabolisation du BaA, avec une fois encore, la non influence du procédé de bioaugmentation. Dans tous les cas, l'association des deux méthodes (bioaugmentation et biostimulation) n'a jamais conduit à des effets antagonistes.

3.2.3. Evaluation de la dissipation du benzo(a)anthracène

Dans le but de vérifier l'effet de la bioaugmentation et de la biostimulation sur la dissipation du BaA, un dosage total du polluant a été réalisé au cours du temps. Afin de déterminer la fraction potentiellement dégradable et toxique de celui-ci, un dosage de sa teneur biodisponible a également été effectué.

3.2.3.1. Dosage total

La concentration en BaA totale mesurée dans les sols est présentée sur la figure 67. Au début de l'expérimentation (T0), la totalité du BaA ajouté dans les sols (50,68 mg.kg⁻¹) n'est pas récupérée. En effet, des teneurs en BaA de $34,78 \pm 0,52$ mg.kg⁻¹, $33,46 \pm 0,37$ mg.kg⁻¹ et $35,88 \pm 0,36$ mg.kg⁻¹ ont été dosées respectivement dans les sols sans consortium (Figure 67 A), avec consortium (Figure 67 B), et avec consortium et champignon (Figure 67 C). Ceci

correspond à un rendement d'environ 68,5 % ce qui est cohérent avec les résultats obtenus lors de l'expérimentation de phyto/rhizoremédiation (70,8 % ; Figure 54). Ce rendement peut être expliqué comme lors de cette expérience (paragraphe 3.1.4.1.) par un procédé d'extraction (soxhlet) non optimal, du notamment au solvant utilisé, et/ou par une forte adsorption rapide de molécules de BaA sur les particules de sol lors de la période de stockage des échantillons à 4°C pendant 48h entre la contamination du sol et l'extraction du HAP. La teneur en BaA retrouvée dans le sol inoculé avec le consortium s'avère significativement plus faible que celle obtenue dans le sol inoculé avec le consortium et le champignon ($p < 0,05$). Cependant, aucune différence significative n'est observée entre le sol non inoculé et les sols inoculés que ce soit avec le consortium seul ou le consortium et le champignon ($p > 0,05$). Ainsi, à T0, puisqu'il n'y a pas de réelles différences entre les échantillons, tous ont un rendement similaire.

Après 3 jours d'exposition (T1), la concentration de BaA est similaire à celle de T0 pour la majorité des sols ($p > 0,05$). Celle-ci a significativement diminué uniquement pour les sols non inoculés TN ($28,03 \pm 0,88 \text{ mg.kg}^{-1}$), E1 ($27,96 \pm 0,26 \text{ mg.kg}^{-1}$) et MxG ($29,26 \pm 1,22 \text{ mg.kg}^{-1}$) ($p < 0,05$; Figure 67 A), ainsi que pour l'échantillon MxG avec consortium ($25,52 \pm 0,94 \text{ mg.kg}^{-1}$) ($p < 0,05$; Figure 67 B). Cependant, il n'existe aucune différence significative entre les traitements (TN, E1, E2 et MxG) des sols sans consortium ($p > 0,05$; Figure 67 A) et l'échantillon MxG des sols inoculés avec le consortium seul est juste significativement plus faible de l'échantillon E2 dont la concentration est de $35,15 \pm 0,18 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($p < 0,05$; Figure 67 B). Ces résultats indiquent donc que la baisse de la teneur en polluant dans les sols est trop faible ($6,76 \text{ mg.kg}^{-1}$ en moyenne) pour pouvoir détecter une réelle différence. Un délai de 3 jours apparaît comme étant trop court pour observer une dissipation du composé. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Thomas et Cébron (2016) où aucune baisse significative de la teneur en phénanthrène n'a été détectée après 2 et 4 jours d'exposition que le sol soit nu, non rhizosphérique ou rhizosphérique. Les microorganismes préfèrent alors certainement dégrader d'autres sources de carbone plus facilement métabolisables que le BaA. C'est pourquoi une augmentation du nombre de copies de gène ARNr 16S a tout de même été obtenue pour tous les sols (sauf TN avec consortium et champignon, Figure 64) ainsi qu'une augmentation de l'abondance en gènes PAH-RHD α GP pour les sols inoculés avec le consortium (Figure 66 B). De plus, ceci pourrait également s'expliquer par une

toxicité du BaA envers les microorganismes dégradants puisqu'une non évolution voire une baisse de la quantité de gènes ARNr 18S a été observée (Figure 65), ainsi que pour le gène PAH-RHD_α GP pour certains échantillons (Figure 66). Ces microorganismes n'ont peut être pas encore exprimé le gène de dégradation. Aussi, l'absence de dissipation du BaA pourrait provenir d'une non biodisponibilité du composé à la microflore. Dans tous les cas, que ce soit la biostimulation ou la bioaugmentation, aucun de ces procédés n'a influencé la teneur en polluant dans les sols à 3 jours d'exposition.

Après 15 jours d'exposition (T2), la concentration en BaA a significativement diminué par rapport à T1 pour la majorité des sols ($p < 0,05$) jusqu'à environ 20 mg.kg^{-1} ce qui représente une baisse en polluant d'environ 42 % (par rapport à T0). Seul l'échantillon TN inoculé avec le consortium seul (Figure 67 B) et les échantillons E1 et E2 inoculés avec le consortium et le champignon (Figure 67 C) présentent une concentration similaire à celle de T1 ($p > 0,05$). Cependant, il n'y a pas de différences significatives entre les traitements ($p > 0,05$; Figures 67 B et C), comme c'est le cas pour les sols non inoculés ($p > 0,05$; Figure 67 A). Cela signifie alors que la biostimulation n'est pas responsable de la dissipation du BaA, ou que son implication n'est pas assez forte, notamment pour les sols bioaugmentés puisque des différences de concentration apparaissent tout de même par rapport à T1 selon les traitements. L'étude de Binet et ses collaborateurs (2000a) a suggéré que la stimulation des microorganismes dégradants était plutôt réalisée par le polluant en lui-même que par la présence d'une plante. En ce qui concerne la bioaugmentation, seul l'échantillon E1 non inoculé possède une dissipation en BaA significativement plus importante que le sol E1 bioaugmenté avec le consortium seul ($19,88 \pm 0,43 \text{ mg.kg}^{-1}$ contre $23,28 \pm 0,46 \text{ mg.kg}^{-1}$; $p < 0,05$). Il n'y a en revanche aucune différence significative entre le sol non inoculé et les deux sols bioaugmentés ($p > 0,05$), ce qui signifie que le procédé de bioaugmentation n'a pas de réel impact sur la dissipation du BaA, et quelque soit le traitement. La dissipation du polluant peut alors provenir d'une métabolisation microbienne du composé. En effet, les résultats obtenus lors de l'analyse de qPCR (Figures 64, 65 et 66) suggèrent une éventuelle toxicité envers les microorganismes à T2. Celle-ci pourrait alors provenir de la présence de métabolites de dégradation du BaA, produits lors de dégradation du composé, plus toxiques que la molécule initiale. Une autre hypothèse, serait que le processus de vieillissement de la contamination ait conduit à la formation de résidus non extractibles de BaA.

A la fin de l'exposition (T3), la teneur en BaA présente dans les sols est en général similaire à celle mesurée à T2 ($p > 0,05$). Malgré une forte hausse du nombre de copies de gènes ARNr 16S et PAH-RHD $_{\alpha}$ GP par rapport à T2 (Figures 64 A et 66 A), le polluant n'a alors pas été plus dégradé. Ceci suggère que la quantité de BaA dosée dans les sols n'engendre plus de toxicité envers les bactéries, celles-ci ne le dégradant alors plus préférentiellement. L'étude de Bacosa et ses collaborateurs (2010) a par exemple montré qu'un consortium microbien utilisait préférentiellement les fractions aromatiques du kérosène qui sont plus toxiques que les fractions aliphatiques. Ainsi, les microorganismes doivent certainement dégrader en priorité les métabolites de dégradation du BaA qui semblent s'avérer plus toxiques. Ces résultats pourraient également s'expliquer par une adaptation des microorganismes au cours du temps. Si la dissipation en BaA à T2 est expliquée par la formation de résidus non extractibles, cela pourrait également s'expliquer par une concentration en polluant mesurée dans les sols non toxique ce qui facilita la croissance de la microflore.

Un échantillon de chaque modalité (sans consortium, avec consortium, avec consortium et champignon) a cependant vu sa concentration significativement augmenter par rapport à T2 ($p < 0,05$). Pour les sols non inoculés il s'agit de l'échantillon TN ($29,06 \pm 1,63 \text{ mg.kg}^{-1}$ contre $20,72 \pm 0,08 \text{ mg.kg}^{-1}$ à T2), et pour les sols bioaugmentés de l'échantillon MxG ($28,82 \pm 0,71 \text{ mg.kg}^{-1}$ contre $20,51 \pm 0,42 \text{ mg.kg}^{-1}$ à T2 pour les sols inoculés avec le consortium, et $30,97 \pm 2,00 \text{ mg.kg}^{-1}$ contre $18,98 \pm 1,92 \text{ mg.kg}^{-1}$ à T2 pour les sols inoculés avec le consortium et le champignon). Ces résultats sont confirmés par une concentration significativement supérieure en BaA dans ces sols par rapport aux autres traitements ($p < 0,05$). La teneur des échantillons TN sans consortium et MxG avec consortium restent cependant significativement inférieure à celle de T0 ($26,06 \pm 1,63 \text{ mg.kg}^{-1}$ contre $34,78 \pm 0,52 \text{ mg.kg}^{-1}$ pour le sol TN, et $28,81 \pm 0,71 \text{ mg.kg}^{-1}$ contre $33,46 \pm 0,37 \text{ mg.kg}^{-1}$ pour le sol MxG ; $p < 0,05$), alors que celle de l'échantillon MxG avec le consortium et le champignon est devenue similaire à celle de T0 ($p > 0,05$). L'augmentation de la teneur en BaA dans ces sols, pourrait provenir d'une augmentation de sa biodisponibilité, traduisant alors une séquestration probable du composé dans les sols à T1 et T2. Ainsi, pour l'échantillon TN non inoculé, cela suggère que certaines molécules composant les exsudats (E1, E2 et MxG) ont sélectionné des microorganismes qui produisent des surfactants, rendant alors le polluant biodisponible, et/ou qu'elles ont induit une modification du pH ce qui a engendré une modification de la biodisponibilité du BaA. Pour les sols bioaugmentés (avec consortium et, avec consortium et

champignon), la non biodisponibilité du contaminant à T1 et T2 semble provenir de la présence du consortium dans le sol planté, celui-ci ayant certainement favorisé la sorption du BaA sur les racines par la production d'autres types de surfactant. L'augmentation de la biodisponibilité aurait alors conduit à une fixation racinaire. De plus, la présence de l'inoculum a pu causer une modification du pH du sol plus importante en présence de la plante (en raison de ses nombreux rhizodépôts) ce qui a causé une fixation du BaA sur les racines et/ou les particules de sol. Cette hypothèse est confortée par la comparaison des différents types de bioaugmentation, où une teneur en polluant significativement plus importante a été retrouvée dans le sol TN non inoculé par rapport aux sols bioaugmentés ($29,06 \pm 1,63 \text{ mg.kg}^{-1}$ contre $18,30 \pm 0,76 \text{ mg.kg}^{-1}$ pour le sol inoculé avec le consortium et $20,25 \pm 1,18 \text{ mg.kg}^{-1}$ pour le sol inoculé avec le consortium et le champignon ; $p < 0,05$), et une concentration en BaA significativement plus faible dans le sol planté par MxG non inoculé par rapport aux sols bioaugmentés ($18,19 \pm 0,44 \text{ mg.kg}^{-1}$ contre $28,82 \pm 0,71 \text{ mg.kg}^{-1}$ pour le sol inoculé avec le consortium et $30,97 \pm 2,00 \text{ mg.kg}^{-1}$ pour le sol inoculé avec le consortium et le champignon ; $p < 0,05$).

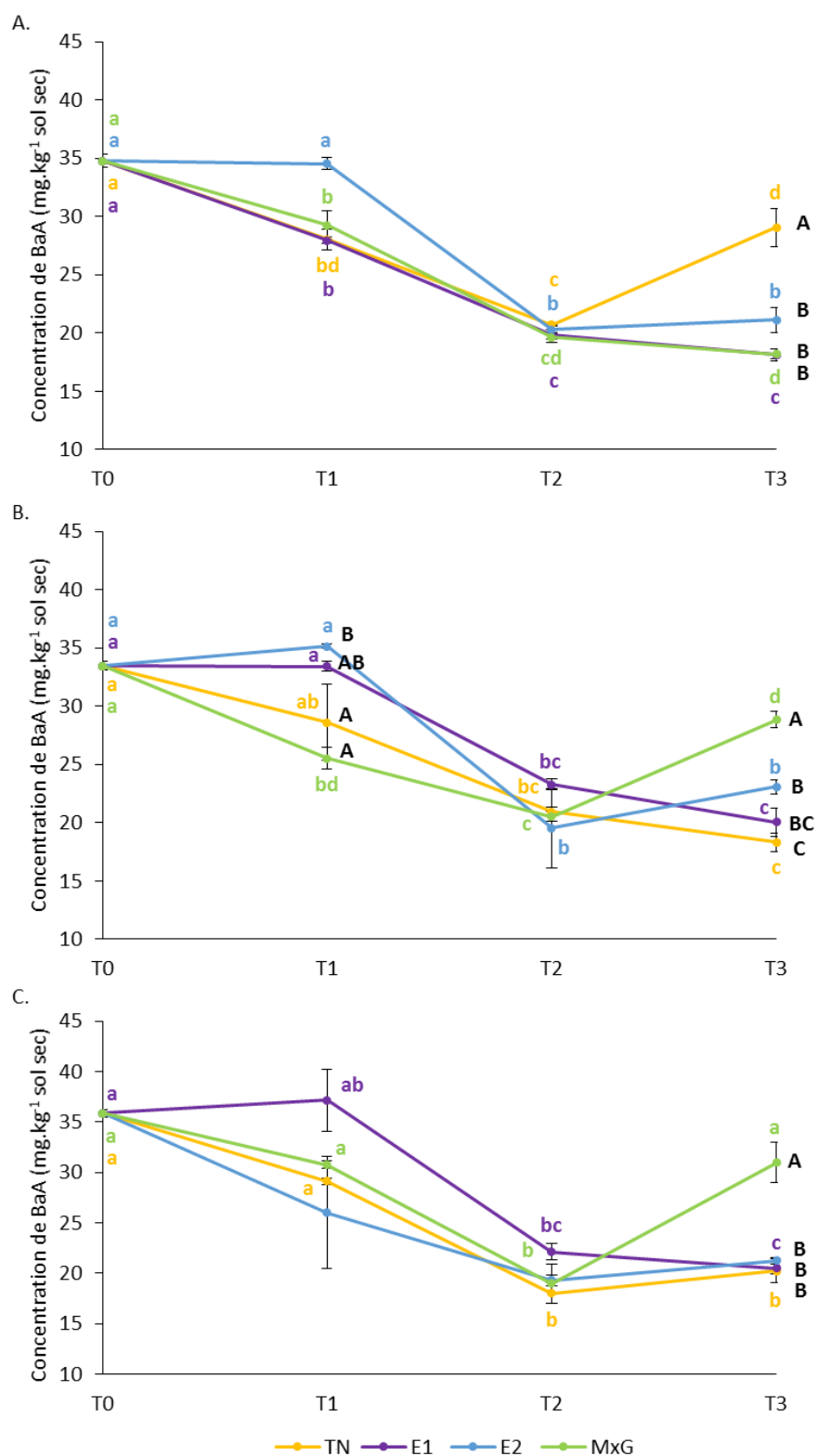


Figure 67. Concentration en BaA totale (mg.kg^{-1} sol sec, moyenne $\pm$ écart type, $n=3$) mesurée dans les sols contaminés sans consortium (A), avec consortium (B) et avec consortium plus champignon (C) au cours du temps (de T0 à T3) en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence de traitement (TN). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre T0, T1, T2 et T3 pour chaque traitement (orange : TN, violettes : E1, bleues : E2, vertes : MxG, $p < 0,05$). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre chaque traitement à chaque temps de prélèvement T1, T2 et T3 ($p < 0,05$).

3.2.3.2. Dosage des fractions biodisponibles

Le dosage des fractions biodisponibles du BaA (dissous et facilement désorbable) dans les sols en début et en fin d'expérimentation est présenté dans le tableau 34.

A T0, quelles que soient les conditions du sol (SC : sans consortium, C : avec consortium ou C+CH : avec consortium et champignon), environ 50 % du BaA ajouté (par rapport à la teneur en BaA ajoutée dans les sols : $50,68 \text{ mg.kg}^{-1}$) se trouve sous forme biodisponible et de façon majoritaire dans la fraction facilement désorbable. Ces résultats sont proches de ceux obtenus lors de l'expérience de phyto/rhizoremédiation (paragraphe 3.1.4.2.) avec 44 % du polluant se trouvant dans ses deux fractions à T0 (Figure 55). La faible teneur dans la fraction dissoute est due au caractère hydrophobe du polluant. Seul le sol inoculé avec le consortium et le champignon (C+CH) ne présente pas de différences significatives entre les deux fractions ($p > 0,05$). En début d'exposition (T0), la bioaugmentation ne présente aucune influence sur la biodisponibilité du composé puisqu'aucune différence significative n'a été détectée, quelle que soit la fraction ($p > 0,05$).

A la fin de l'exposition (T3), d'une manière générale, tous les échantillons possèdent une concentration en BaA significativement plus élevée dans la fraction désorbable ($p < 0,05$). Les exceptions concernent le sol E2 inoculé avec le consortium (C, $p > 0,05$) et le sol E1 inoculé avec le consortium et le champignon (C+CH, $p > 0,05$). Encore une fois, la faible solubilité du BaA dans l'eau explique sa faible concentration dans la fraction dissoute. De plus, quel que soit l'échantillon, aucune différence significative n'a été détectée entre T0 et T3 pour cette fraction ($p > 0,05$), soulignant bien son caractère hydrophobe. Aussi, aucune évolution de la teneur en BaA facilement désorbable n'a été observée entre T0 et T3 pour tous les sols non inoculés ($p > 0,05$) bien qu'une différence significative existe entre les échantillons E1 et MxG non inoculés ($p < 0,05$). Ainsi, en absence de bioaugmentation, la quantité de BaA biodisponible s'est maintenue au cours du temps, la biostimulation (E1, E2 et MxG) n'ayant eu aucun effet réel. De ce fait, l'hypothèse de l'absence de l'augmentation de la teneur en polluant total dans les sols E1, E2 et MxG par rapport au sol TN à T3 (Figure 67 A) ne peut pas être expliquée par une biodisponibilité plus élevée du BaA grâce aux exsudats. Il semblerait plutôt que le polluant soit toujours séquestré dans les sols subissant la biostimulation (comme à T2, Figure 67 A) en raison certainement d'une présence plus

importante de matière organique grâce à une activité microbienne plus importante. En revanche, à T3, pour les sols inoculés avec le consortium seul (C), une augmentation significative de la teneur en polluant a été mesurée par rapport à T0 dans la fraction désorbable pour les échantillons TN, E1 et E2 ($p < 0,05$), le sol planté (MxG) ne présentant pas d'évolution ($p > 0,05$). De plus, les sols TN et E1 possèdent une concentration significativement plus élevée que le sol MxG ($p < 0,05$). De ce fait, la présence du consortium a conduit à une augmentation de la partie désorbable du BaA dans le sol grâce certainement à la production de surfactants. La présence de la plante semble avoir inhibé cet effet *via* probablement une sorption du polluant sur ses racines et/ou les particules de sol comme cela a été suggéré lors de l'analyse du dosage total en BaA (Figure 67 B). Néanmoins, aucune différence significative n'a été observée entre les différents types de bioaugmentation (SC, C, C + CH) en ce qui concerne la fraction facilement désorbable mais également dissoute ($p > 0,05$), ce qui suggère que l'effet du consortium n'est pas assez important pour qu'une différence significative puisse être détectée. Pour les sols inoculés avec le consortium et le champignon (C+CH), cette fois ci, seul le sol planté (MxG) contient une quantité en BaA facilement désorbable significativement plus élevée à T3 qu'à T0 ($p < 0,05$). Cependant, cette teneur s'avère significativement plus faible que les sols TN et E1 ($p < 0,05$). Ainsi, il n'y a pas de réelle évolution de la concentration en BaA facilement désorbable dans les sols inoculés avec le consortium associé au champignon et il n'y a pas d'influence claire de la biostimulation. La présence du champignon semble en être responsable, probablement *via* une inhibition de la croissance bactérienne comme cela a déjà été suggéré lors des analyses de qPCR. Cela aurait alors engendré une réduction de la présence de surfactants produits par les microorganismes du consortium. De ce fait, les molécules de BaA dans les sols TN, E1 et E2 des sols inoculés avec le consortium et le champignon seraient alors toujours séquestrées dans le sol (comme à T2, Figure 67 C). Ceci pourrait par exemple s'expliquer par un pH plus faible que dans le sol planté (MxG), conduisant à une augmentation de l'adsorption du HAP.

Tableau 34. Concentrations en BaA dissous et facilement désorbable (mg.kg^{-1} sol sec, moyenne $\pm$ écart type, $n=3$) mesurées dans les sols contaminés sans consortium (SC), avec consortium (C) et avec consortium plus champignon (C+CH) à T0 et T3 en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence de traitement (TN). La présence d'un astérisque représente une différence significative entre le BaA dissous et facilement désorbable pour chaque échantillon ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre chaque traitement pour chaque fraction biodisponible et chaque type de sol ($p < 0,05$). Différentes lettres majuscules représentent une différence significative entre T0 et T3 pour chaque échantillon et chaque fraction biodisponible ($p < 0,05$).

		T0		T3	
		BaA dissous	BaA facilement désorbable	BaA dissous	BaA facilement désorbable
SC	TN	2,96 $\pm$ 0,52	* 22,67 $\pm$ 0,75	3,40 $\pm$ 0,83	* 31,39 $\pm$ 3,37 ab
	E1			1,64 $\pm$ 0,24	* 48,54 $\pm$ 8,54 a
	E2			2,93 $\pm$ 1,07	* 28,13 $\pm$ 1,71 ab
	MxG			2,33 $\pm$ 0,26	* 21,52 $\pm$ 2,97 b
C	TN	2,92 $\pm$ 0,91	* 20,77 $\pm$ 0,64 A	1,36 $\pm$ 0,13	* 28,84 $\pm$ 1,80 a B
	E1			1,51 $\pm$ 0,05	* 29,13 $\pm$ 0,54 a B
	E2			2,23 $\pm$ 0,83	25,74 $\pm$,85 ab B
	MxG			2,45 $\pm$ 0,61	* 22,55 $\pm$ 0,31 b A
C + CH	TN	6,35 $\pm$ 1,90	20,47 $\pm$ 1,05 A	1,36 $\pm$ 0,17	* 34,28 $\pm$ 5,32 a A
	E1			2,53 $\pm$ 0,63	29,30 $\pm$ 0,73 a A
	E2			1,51 $\pm$ 0,10	* 22,68 $\pm$ 0,47 b A
	MxG			5,56 $\pm$ 2,97	* 26,43 $\pm$ 0,70 b B

3.2.3.3. Conclusion

D'une manière générale, une baisse de la teneur totale en BaA a été obtenue pour tous les sols à 15 jours d'exposition (T2). Cette dissipation peut être expliquée par une dégradation microbienne du composé, celle-ci étant alors cohérente avec les résultats obtenus lors des analyses de qPCR. En effet, une éventuelle toxicité du polluant a été observée au niveau de la densité des gènes microbiens, ce qui conforterait l'hypothèse de la présence de métabolites de dégradation plus toxiques que la molécule initiale en raison de la métabolisation du composé. La dissipation de la teneur en polluant peut néanmoins être également expliquée par la séquestration du BaA dans le sol et la formation possible de résidus non extractibles. En effet, les résultats des dosages totaux à la fin de l'exposition (T3) ont témoigné d'une éventuelle séquestration du composé dans le sol à T2 pour les échantillons TN sans consortium, MxG avec consortium et MxG avec consortium et champignon. Pour le sol TN non inoculé, les mesures de biodisponibilité ont finalement

montré que le BaA semblait séquestré pour l'ensemble des échantillons non inoculés et de façon plus importante pour les sols biostimulés en raison certainement d'une teneur plus élevée en matière organique. En revanche, même si son effet n'est pas assez important, la présence du consortium bactérien induirait la production de surfactants, augmentant alors la biodisponibilité du BaA dans le sol. Celle-ci serait cependant inhibée par la présence de la plante (MxG) en raison d'une éventuelle sorption sur les racines et/ou les particules de sol *via* une modification du pH par exemple. Cette hypothèse expliquerait alors les résultats obtenus pour l'échantillon MxG avec consortium et suggérerait une éventuelle dégradation microbienne du polluant pour les autres échantillons inoculés avec le consortium (TN, E1 et E2). Néanmoins, les résultats des analyses de biodisponibilité du BaA pour l'échantillon MxG avec le consortium et le champignon, semblent montrer que la présence de la souche fongique, *Fusarium oxysporum*, inhibe la croissance du consortium bactérien, ce qui réduirait la production de surfactants. De ce fait, le polluant serait séquestré pour l'ensemble des échantillons inoculés avec le consortium et le champignon, et de façon plus importante pour les sols TN, E1 et E2 en raison probablement d'un pH plus faible que celui du sol planté (MxG).

3.2.4. Evaluation de la toxicité des sols

L'évolution de la toxicité des sols en début (T0) et en fin d'expérimentation (T3) a été analysée par un des tests d'écotoxicité qui s'est montré le plus sensible lors de l'expérience de phyto/rhizoremédiation (paragraphe 3.1.5.), à savoir l'essai chronique avec l'orge, afin d'évaluer l'impact de la bioaugmentation et de son association à la biostimulation sur le caractère toxique du BaA (Tableau 3).

Au début de l'expérimentation (T0), le polluant présente une toxicité envers la germination des graines d'orge puisqu'un taux d'émergence significativement plus faible a été mesuré par rapport à T3 pour tous les échantillons ($p < 0,05$). Ce résultat est cohérent avec celui obtenu par l'expérience de phyto/rhizoremédiation où un impact toxique du BaA a été révélé à T0 avec un taux d'émergence de $62,5 \pm 12,5$ % (Figure 56). Cette toxicité peut s'expliquer par la biodisponibilité du BaA, environ 50 % de celui-ci se trouvant sous forme biodisponible (Tableau 33). Le composé a alors pu pénétrer les graines et affecter leur système enzymatique comme dans l'étude de Kummerová et Kmentová (2004) où la

présence de fluoranthène dans l'endosperme de graines a inhibé l'activité de l'acide gibbérellique ainsi que de plusieurs enzymes hydrolytiques, affectant alors l'assimilation d'eau. Aussi, à cause du caractère hydrophobe du polluant, celui-ci a pu s'adsorber à la surface des graines ce qui a pu réduire la prise d'eau. A T3, aucun des procédés de remédiation (bioaugmentation, biostimulation) ne semble avoir influencé la réduction de toxicité puisqu'aucune différence significative n'a été obtenue entre les différents traitements (TN, E1, E2 et MxG) et entre les différentes modalités de bioaugmentation (SC, C et C+CH) quel que soit le sol ($p > 0,05$). Cela proviendrait alors de la baisse de la teneur totale en BaA en fin d'expérimentation (Figure 67), celle-ci ne provoquant alors plus de toxicité en raison d'une dégradation et/ou d'une séquestration dans le sol. Aussi, comme la concentration en polluant biodisponible reste d'une manière générale similaire à celle de T0 (Tableau 33), cela pourrait également être expliqué par un piégeage de molécules de BaA dans les micelles de surfactants produits par les microorganismes, ce qui au final réduirait leur biodisponibilité.

En revanche, l'effet inverse est observé pour la biomasse des pousses. En effet, une baisse significative de la masse de pousses sèches a été déterminée à T3 par rapport à T0 pour tous les échantillons ($p < 0,05$). Malgré une différence significative entre les traitements TN et MxG des sols inoculés avec le consortium (C, $p < 0,05$), aucun effet de la biostimulation n'a été reporté quel que soit le type de sol (SC, C et C+CH ; $p > 0,05$). Aussi, aucune différence significative n'a été déterminée en ce qui concerne le procédé de bioaugmentation ($p > 0,05$). Ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus lors de l'expérience de phyto/rhizoremédiation car aucune toxicité n'avait été révélée au niveau de la biomasse des pousses (Figure 57). En revanche, le temps d'exposition de cette expérimentation était plus long (365 jours contre 105 jours). La toxicité observée pourrait alors provenir de la présence de métabolites de dégradation du BaA plus toxiques que le composé initial mais également plus solubles. Ainsi, les molécules ont pu être prélevées par les racines, transloquées dans les plants d'orge et ainsi affecter leur croissance. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude de Eom et ses collaborateurs (2007) où dans un sol contaminé aux HAP (2634 mg.kg^{-1}), la croissance des plantes (laitue et choux chinois) a été inhibée à la fin de l'exposition du test d'écotoxicité contrairement à la germination.

Tableau 35. Pourcentage d'émergence des graines d'orge exposées pendant 4 jours (moyenne $\pm$ écart type, $n=4$) et biomasse des pousses exposées pendant 14 jours après l'émergence des graines (moyenne $\pm$ écart type, $n=4$) dans les sols contaminés sans consortium (SC), avec consortium (C) et avec consortium plus champignon (C+CH) à T0 et T3 en présence des mélanges d'exsudats racinaires (E1 ou E2), de la plante (MxG) et en absence de traitement (TN). La présence d'un astérisque représente une différence significative entre T0 et T3 pour chaque échantillon et chaque mesure (émergence, biomasse) ($p < 0,05$). Différentes lettres minuscules représentent une différence significative entre chaque traitement pour chaque mesure (émergence, biomasse) et chaque type de sol ($p < 0,05$).

			Emergence (%)	Biomasse (g)
T0			64,58 $\pm$ 6,25	0,219 $\pm$ 0,007
T3	SC	TN	89,58 $\pm$ 3,99 *	0,118 $\pm$ 0,007 *
		E1	91,67 $\pm$ 3,40 *	0,104 $\pm$ 0,007 *
		E2	95,83 $\pm$ 2,41 *	0,097 $\pm$ 0,006 *
		MxG	95,83 $\pm$ 2,41 *	0,109 $\pm$ 0,007 *
	C	TN	95,83 $\pm$ 2,41 *	0,108 $\pm$ 0,007 * a
		E1	91,67 $\pm$ 3,40 *	0,115 $\pm$ 0,004 * ab
		E2	91,67 $\pm$ 5,89 *	0,112 $\pm$ 0,003 * ab
		MxG	95,83 $\pm$ 2,41 *	0,133 $\pm$ 0,007 * b
	C + CH	TN	95,83 $\pm$ 2,41 *	0,127 $\pm$ 0,007 *
		E1	87,5 $\pm$ 2,41 *	0,109 $\pm$ 0,002 *
		E2	95,83 $\pm$ 2,41 *	0,121 $\pm$ 0,009 *
		MxG	85,41 $\pm$ 5,24 *	0,107 $\pm$ 0,009 *

Au début de l'expérimentation (T0), le BaA présente une toxicité envers la germination des graines d'orge. A la fin de l'exposition (T3), celle-ci s'est dissipée grâce certainement à la diminution de la concentration en polluant. En revanche, à T3, la production de biomasse a été réduite alors qu'aucune toxicité n'a été observée à T0. La biomasse pourrait alors être un marqueur plus sensible que la germination, traduisant la présence éventuelle de métabolites de dégradation du BaA.

3.2.5. Conclusion générale

Le BaA présent à une concentration de 50,68 mg.kg⁻¹ (concentration ajoutée dans le sol) en début d'exposition (T0), montre une toxicité envers l'émergence des graines d'orge, la biomasse des pousses étant moins sensible. Cette toxicité, peut s'expliquer notamment par la présence d'environ 50 % de la concentration totale en BaA (par rapport à ce qui a été ajouté dans le sol, soit 50,68 mg.kg⁻¹) sous forme biodisponible (fractions dissoute et facilement désorbable). Après 105 jours d'exposition (T3, fin d'exposition), le caractère

toxique du polluant vis-à-vis de l'émergence s'est dissipé pour laisser place à une toxicité envers la biomasse des pousses. La plus faible teneur en BaA mesurée dans la majorité des sols par rapport en début d'expérimentation (environ 22 mg.kg⁻¹ en moyenne contre 35 mg.kg⁻¹ en moyenne) semble expliquer ce phénomène. Même si la biodisponibilité du composé (fractions dissoute et facilement désorbable) s'avère similaire à celle de T0, voire plus importante pour certains échantillons (sols avec consortium TN, E1 et E2), la réduction de la teneur totale en polluant a conduit à une concentration qui ne présente plus de toxicité envers les graines d'orge (émergence). De plus, parmi le BaA biodisponible, certaines molécules ont pu être piégées dans les micelles des surfactants produits par la microflore, devenant alors au final, non biodisponibles. La dissipation de la teneur totale en polluant peut provenir d'une dégradation microbienne du composé, la formation de métabolites de dégradation conduisant alors à une toxicité plus importante que la molécule initiale. Les intermédiaires de dégradation auraient pu affecter la biomasse des pousses d'orge, celles-ci s'avérant alors plus sensibles aux métabolites. Cette hypothèse expliquerait également la baisse de la croissance fongique totale dans les sols, due à une diminution du nombre de copies de gènes ARNr 18S au cours du temps ainsi que du ratio ARNr 18S/ARNr 16S. De plus, une forte augmentation du nombre de copies de gènes ARNr 16S et PAH-RHD_α GP a été obtenue dans les sols en fin d'exposition, ce qui laisse suggérer une augmentation de la croissance de ces microorganismes, engendrant une métabolisation du BaA. La dégradation du contaminant serait alors plus importante dans le sol planté par MxG puisqu'une plus forte augmentation de la quantité de gènes ARNr 16S et PAH-RHD_α GP a été obtenue par rapport aux autres traitements (TN, E1 et E2) pour tous les sols (non inoculé, inoculé avec le consortium, inoculé avec le consortium et le champignon) en fin d'exposition, ainsi qu'une diminution plus importante de l'abondance en gènes ARNr 18S. L'impact de la bioaugmentation a probablement était masqué par l'influence de la plante puisque des effets de ce procédé ont pu être observé au cours du temps, avec de façon générale, la présence d'un nombre de copies de gènes plus important (ARNr 16S et PAH-RHD_α GP) ou plus faible (ARNr 18S) dans les sols inoculés avec le consortium seul que dans les sols non inoculés. La présence de la souche fongique, *Fusarium oxysporum*, semble en effet ne pas impacter la croissance des microorganismes, voire présenter un effet inhibiteur.

La dissipation de la teneur totale en polluant peut toutefois aussi s'expliquer par la séquestration du composé dans le sol et la formation de résidus non extractibles. En effet, les résultats des dosages totaux de BaA à la fin de l'expérimentation, ont révélé que pour certains échantillons, le composé se trouvait finalement séquestré dans le sol (non extractible au soxhlet) puisque la teneur mesurée avait augmenté par rapport au précédent point de prélèvement (T2 : 15 jours). Les résultats des dosages de biodisponibilité montrent que la majeure partie de la diminution de la teneur en BaA serait plutôt expliquée par une séquestration pour tous les échantillons non inoculés et inoculés avec le consortium et le champignon. En revanche, la présence seule du consortium bactérien aurait conduit à une amélioration de la biodisponibilité du composé *via* la production de surfactants, ce qui aurait engendré une plus forte dégradation du BaA par rapport aux autres sols. La présence de la souche fongique aurait probablement induit une inhibition de la croissance des microorganismes du consortium, diminuant ainsi la présence de surfactants. Ce caractère inhibiteur du champignon a notamment pu être observé pour certains échantillons, au cours du temps, lors des analyses de densités de gènes microbiens, par une diminution du nombre de copies. L'association de MxG à la bioaugmentation impacte toutefois la biodisponibilité du composé. Pour les sols inoculés avec le consortium seul, il semble y avoir une fixation du polluant sur les racines de la plante et/ou une adsorption plus importante sur les particules de sol due à une modification du pH par exemple. En ce qui concerne les sols inoculés avec le consortium et le champignon, cette association conduirait plutôt à une meilleure désorption du contaminant *via* également une modification du pH. Ce sont les seuls résultats où une influence réelle de l'association des deux procédés de remédiation a pu être observée.

Dans le but d'améliorer la dissipation du BaA, le choix du procédé se porterait alors plutôt sur la biostimulation seule, à l'aide de MxG, les mélanges d'exsudats n'ayant au final (fin d'exposition) aucune réelle influence.

CONCLUSION GENERALE

4. CONCLUSION GENERALE

Le but de ces travaux de thèse était d'étudier l'impact de MxG sur la dissipation du BaA, un HAP peu considéré en remédiation, à partir d'un sol artificiellement contaminé et d'en expliquer les mécanismes par une approche multidisciplinaire. Deux expérimentations avaient alors été mises en place afin d'analyser directement l'influence de la plante dans sa rhizosphère et indirectement en utilisant des composés présents dans ses exsudats racinaires ainsi que des microorganismes associés à sa rhizosphère ayant des capacités catalytiques de dégradation du BaA.

Les résultats obtenus ont montré que la plante MxG tolèrait la présence du BaA malgré une toxicité du sol et conduisait à une dissipation 3 fois plus importante de la concentration en polluant dans sa rhizosphère après 12 mois d'exposition. Cette stimulation est due à une augmentation de la biodisponibilité du contaminant ainsi qu'à une influence positive sur la microflore tellurique *via* une modification de la structure des communautés bactériennes et une stimulation de la croissance des microorganismes conduisant probablement à une sélection de microorganismes spécifiques impliqués dans le processus de bioremédiation. Afin d'approfondir ces résultats, il serait intéressant de dessiner des amorces qui ciblent des gènes de dégradation du BaA dans le but de suivre spécifiquement cette microflore mais également d'étudier l'expression de ces gènes en dosant directement les enzymes de dégradation ou les ARN messagers qui permettent leur synthèse. En effet, la quantification des gènes permet uniquement d'appréhender le potentiel génétique de dégradation des communautés microbiennes puisque les enzymes peuvent ne pas être synthétisées. De plus, il serait intéressant de doser les métabolites de dégradation du BaA afin de confirmer la dégradation microbienne du composé. Par la suite, des essais avec du sol provenant de sites contaminés permettraient d'évaluer les capacités de dissipation du BaA par MxG en conditions réelles avec les potentielles interactions pouvant intervenir par la présence d'autres contaminants. En effet, les sols pollués sont souvent caractérisés par une contamination multiple (présence d'autres molécules organiques et/ou de métaux). Aussi, il serait intéressant de quantifier la présence éventuelle du polluant dans les parties aériennes de l'espèce végétale par marquage isotopique du composé. Ainsi, en absence de translocation du polluant dans la plante, MxG pourrait être cultivée sur des sols pollués car

elle apparaît comme étant prometteuse pour améliorer la dissipation des HAP, et notamment des composés récalcitrants, et être valorisée par différentes voies (bioénergies, biomatériaux,...). La phyto/rhizoremédiation de friches industrielles à l'aide de MxG permettrait alors d'utiliser ces sites qui sont abandonnés, de les dépolluer, d'améliorer la qualité de leur sol et de valoriser la biomasse produite. De ce fait, cette démarche génèrerait une économie circulaire.

En revanche, les essais de bioaugmentation/biostimulation ont surtout montré une influence positive de la plante seule. Ceci souligne la complexité des mécanismes rhizosphériques mais également l'importance du choix des souches microbiennes et des composés nutritifs ainsi que de leurs associations lors de ce type de procédés. Il serait alors intéressant par la suite d'améliorer cette expérimentation en testant des concentrations plus importantes (cellulaires et exsudats) et d'utiliser une échelle de temps plus longue comme pour l'expérience de phyto/rhizoremédiation. Aussi, l'étude d'autres composés racinaires de MxG avec différentes combinaisons permettrait d'approfondir les connaissances au niveau de l'influence rhizosphérique de MxG dans la biodégradation des HAP. D'autres microorganismes pourraient également être testés comme par exemple le deuxième consortium qui avait été isolé lors de la première expérimentation. De plus, comme le procédé de phyto/rhizoremédiation est un processus long, il serait intéressant d'analyser les effets du couplage de l'ensemble des méthodes (bioaugmentation, biostimulation et phyto/rhizoremédiation) afin de l'accélérer dans l'optique d'utiliser MxG sur des friches industrielles.

REFERENCES

5. REFERENCES

- Abdullahi, K.L., Delgado-Saborit, J.M., Harrison, R.M., 2013. Emissions and indoor concentrations of particulate matter and its specific chemical components from cooking: A review. *Atmos. Environ.* 71, 260–294. doi:10.1016/j.atmosenv.2013.01.061
- Abhilash, P.C., Jamil, S., Singh, N., 2009. Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnol. Adv.* 27, 474–488. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.04.002
- Adam, G., Duncan, H.J., 1999. Effect of Diesel Fuel on Growth of Selected Plant Species. *Environ. Geochem. Health* 21, 353–357. doi:10.1023/A:1006744603461
- Bert, V., 2013. Les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués : Etat de l'art et guide de mise en oeuvre. ADEME. EDP Sciences, Les Ulis.
- Cadière, F., 2012. Taux d'utilisation et coût des différentes techniques et filières de traitement des sols et des eaux souterraines pollués en France : synthèse des données de 2012 (Etude). ADEME. France.
- Agindotan, B.O., Ahonsi, M.O., Domier, L.L., Gray, M.E., Bradley, C.A., 2009. A method for the identification of RNA viruses of *Miscanthus* and switchgrass. *Phytopathology* 99.
- Ahangar, A.G., 2010. Sorption of PAHs in the soil environment with emphasis on the role of soil organic matter: a review. *World Appl. Sci. J.* 11, 759–765.
- Ahonsi, M.O., Agindotan, B.O., Williams, D.W., Arundale, R., Gray, M.E., Voigt, T.B., Bradley, C.A., 2010. First Report of *Pithomyces chartarum* Causing a Leaf Blight of *Miscanthus × giganteus* in Kentucky. *Plant Dis.* 94, 480–480. doi:10.1094/PDIS-94-4-0480C
- Ahtiainen, J., Valo, R., Järvinen, M., Joutti, A., 2002. Microbial Toxicity Tests and Chemical Analysis as Monitoring Parameters at Composting of Creosote-Contaminated Soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53, 323–329. doi:10.1006/eesa.2002.2225
- Alexander, M., 2000. Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4259–4265. doi:10.1021/es001069+
- Alkio, M., Tabuchi, T.M., Wang, X., Colón-Carmona, A., 2005. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *J. Exp. Bot.* 56, 2983–2994. doi:10.1093/jxb/eri295
- Alkorta, I., Garbisu, C., 2001. Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresour. Technol., Reviews Issue* 79, 273–276. doi:10.1016/S0960-8524(01)00016-5
- Ambrosoli, R., Petruzzelli, L., Luis Minati, J., Ajmone Marsan, F., 2005. Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions. *Chemosphere* 60, 1231–1236. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.02.030

- Amellal, N., Portal, J.-M., Berthelin, J., 2001a. Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. *Appl. Geochem.* 16, 1611–1619. doi:10.1016/S0883-2927(01)00034-8
- Amellal, N., Portal, J.-M., Vogel, T., Berthelin, J., 2001b. Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-degrading bacteria within polluted soil aggregates. *Biodegradation* 12, 49–57. doi:10.1023/A:1011909107858
- Amora-Lazcano, E., Guerrero-Zuniga, L.A., Rodriguez-Tovar, A., Rodriguez-Dorantes, A., Vasquez-Murrieta, M.S., 2010. Rhizospheric plant-microbe interactions that enhance the remediation of contaminated soils. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* 1, 251–6.
- Andreolli, M., Lampis, S., Brignoli, P., Vallini, G., 2015. Bioaugmentation and biostimulation as strategies for the bioremediation of a burned woodland soil contaminated by toxic hydrocarbons: A comparative study. *J. Environ. Manage.* 153, 121–131. doi:10.1016/j.jenvman.2015.02.007
- Angers, D.A., Caron, J., 1998. Plant-induced changes in soil structure: Processes and feedbacks 55–72. doi:10.1007/978-94-017-2691-7_3
- Annweiler, E., Michaelis, W., Meckenstock, R.U., 2002. Identical Ring Cleavage Products during Anaerobic Degradation of Naphthalene, 2-Methylnaphthalene, and Tetralin Indicate a New Metabolic Pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 852–858. doi:10.1128/AEM.68.2.852-858.2002
- Antoni, V., 2013. Basol : un panorama des sites et sols pollués, ou potentiellement pollués, nécessitant une action des pouvoirs publics.
- Antoniadis, V., Koliniati, R., Efstratiou, E., Golia, E., Petropoulos, S., 2016. Effect of soils with varying degree of weathering and pH values on phosphorus sorption. *CATENA* 139, 214–219. doi:10.1016/j.catena.2016.01.008
- Anyanwu, I.N., Semple, K.T., 2015. Phytotoxicity of Phenanthrene and Its Nitrogen Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Analogues in Ageing Soil. *Water. Air. Soil Pollut.* 226, 1–12. doi:10.1007/s11270-015-2589-x
- Aprill, W., Sims, R.C., 1990. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20, 253–265. doi:10.1016/0045-6535(90)90100-8
- Arbeli, Z., Fuentes, C.L., 2007. Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. *FEMS Microbiol. Lett.* 272, 269–275.
- Bacic, A., Moody, S., McComb, J., Hinch, J., Clarke, A., 1987. Extracellular Polysaccharides From Shaken Liquid Cultures of *Zea mays*. *Funct. Plant Biol.* 14, 633–641.
- Bacosa, H., Suto, K., Inoue, C., 2010. Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64, 702–710. doi:10.1016/j.ibiod.2010.03.008

- Baduel, P., 2002. Fermentations - Principales applications industrielles.
- Baize, D., 2016. Petit lexique de pédologie: Nouvelle édition augmentée. Editions Quae.
- Baldrian, P., Wiesche, C. in der, Gabriel, J., Nerud, F., Zadražil, F., 2000. Influence of Cadmium and Mercury on Activities of Ligninolytic Enzymes and Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2471–2478. doi:10.1128/AEM.66.6.2471-2478.2000
- Bamforth, S.M., Singleton, I., 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 723–736. doi:10.1002/jctb.1276
- Banks, M.K., Lee, E., Schwab, A.P., 1999. Evaluation of Dissipation Mechanisms for Benzo[a]pyrene in the Rhizosphere of Tall Fescue. *J. Environ. Qual.* 28, 294–298. doi:10.2134/jeq1999.00472425002800010036x
- Barkay, T., Navon-Venezia, S., Ron, E.Z., Rosenberg, E., 1999. Enhancement of Solubilization and Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons by the Bioemulsifier Alasan. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2697–2702.
- BASOL, 2017. BASOL - Ministère de l'Écologie, du Développement Durable et de l'Énergie [WWW Document]. URL <http://basol.developpement-durable.gouv.fr/tableaux/home.htm> (accessed 2.21.17).
- Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A., 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 35, 1183–1192. doi:10.1016/S0038-0717(03)00179-2
- Bayat, Z., Hassanshahian, M., Cappello, S., 2015. Immobilization of Microbes for Bioremediation of Crude Oil Polluted Environments: A Mini Review. *Open Microbiol. J.* 9, 48–54. doi:10.2174/1874285801509010048
- Beale, C.V., Long, S.P., 1997. Seasonal dynamics of nutrient accumulation and partitioning in the perennial C4-grasses *Miscanthus × giganteus* and *Spartina cynosuroides*. *Biomass Bioenergy* 12, 419–428. doi:10.1016/S0961-9534(97)00016-0
- Beale, C.V., Long, S.P., 1995. Can perennial C4 grasses attain high efficiencies of radiant energy conversion in cool climates? *Plant Cell Environ.* 18, 641–650. doi:10.1111/j.1365-3040.1995.tb00565.x
- Beale, C.V., Morison, J.I.L., Long, S.P., 1999. Water use efficiency of C4 perennial grasses in a temperate climate. *Agric. For. Meteorol.* 96, 103–115. doi:10.1016/S0168-1923(99)00042-8
- Benedek, T., Vajna, B., Táncsics, A., Márialigeti, K., Lányi, S., Máthé, I., 2013. Remarkable impact of PAHs and TPHs on the richness and diversity of bacterial species in surface soils exposed to long-term hydrocarbon pollution. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1989–2002.

- Bengough, A.G., McKenzie, B.M., 1997. Sloughing of root cap cells decreases the frictional resistance to maize (*Zea mays* L.) root growth. *J. Exp. Bot.* 48, 885–893. doi:10.1093/jxb/48.4.885
- Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T., 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour. Technol.* 96, 1049–1055. doi:10.1016/j.biortech.2004.09.008
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R.A., Ulrich, A., Hallmann, J., 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51, 215–229. doi:10.1016/j.femsec.2004.08.006
- Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C.E., 1996. Mineralization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 292–295.
- Bezza, F.A., Nkhalambayausi Chirwa, E.M., 2016. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere* 144, 635–644. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.08.027
- Bianciotto, V., Minerdi, D., Perotto, S., Bonfante, P., 1996. Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasma* 193, 123–131. doi:10.1007/BF01276640
- Binet, P., Portal, J., Leyval, C., 2000a. Dissipation of 3–6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biol. Biochem.* 32, 2011–2017. doi:10.1016/S0038-0717(00)00100-0
- Binet, P., Portal, J.M., Leyval, C., 2000b. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant Soil* 227, 207–213. doi:10.1023/A:1026587418611
- Bispo, A., Jourdain, M.J., Jauzein, M., 1999. Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Org. Geochem.* 30, 947–952. doi:10.1016/S0146-6380(99)00078-9
- Blakely, J.K., Neher, D.A., Spongberg, A.L., 2002. Soil invertebrate and microbial communities, and decomposition as indicators of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. *Appl. Soil Ecol.* 21, 71–88. doi:10.1016/S0929-1393(02)00023-9
- Blum, W.E.H., 2005. Functions of Soil for Society and the Environment. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 4, 75–79. doi:10.1007/s11157-005-2236-x
- Bockheim, J.G., Gennadiyev, A.N., Hammer, R.D., Tandarich, J.P., 2005. Historical development of key concepts in pedology. *Geoderma* 124, 23–36. doi:10.1016/j.geoderma.2004.03.004

- Bockheim, J.G., Gennadiyev, A.N., Hartemink, A.E., Brevik, E.C., 2014. Soil-forming factors and Soil Taxonomy. *Geoderma* 226–227, 231–237. doi:10.1016/j.geoderma.2014.02.016
- Bodner, G., Leitner, D., Kaul, H.-P., 2014. Coarse and fine root plants affect pore size distributions differently. *Plant Soil* 380, 133–151. doi:10.1007/s11104-014-2079-8
- Bogan, B.W., Lamar, R.T., 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1597–1603.
- Bogan, B.W., Sullivan, W.R., 2003. Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 52, 1717–1726. doi:10.1016/S0045-6535(03)00455-7
- Bonin, C.L., Heaton, E.A., Barb, J., 2014. *Miscanthus sacchariflorus* – biofuel parent or new weed? *GCB Bioenergy* 6, 629–636. doi:10.1111/gcbb.12098
- Bonnard, M., 2010. Relations “biodisponibilité-génotoxicité-écotoxicité” des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les sols de friches industrielles. Université Paul Verlaine, Metz.
- Boonchan, S., Britz, M.L., Stanley, G.A., 2000. Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1007–1019. doi:10.1128/AEM.66.3.1007-1019.2000
- Boopathy, R., 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour. Technol.* 74, 63–67. doi:10.1016/S0960-8524(99)00144-3
- Bossert, I.D., Bartha, R., 1986. Structure-Biodegradability Relationships of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37:4. doi:10.1007/BF01607793
- Bouchez, M., Blanchet, D., Vandecasteele, J.-P., 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 156–164. doi:10.1007/BF00170638
- Bourcereau, L., 2008. Accumulation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans les sédiments de la rivière Doubs - Rapport Final.
- Bourgoin, F., 2006. Soil protection in French environmental law. *J. Eur. Environ. Plan. Law* 3, 204–212.
- Bowen, G.D., 1994. The ecology of ectomycorrhiza formation and functioning. *Plant Soil* 159, 61–67. doi:10.1007/BF00000095
- Breedveld, G.D., Sparrevik, M., 2000. Nutrient-limited biodegradation of PAH in various soil strata at a creosote contaminated site. *Biodegradation* 11, 391–399. doi:10.1023/A:1011695023196

Bregnard, T.P.-A., Höhener, P., Häner, A., Zeyer, J., 1996. Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 299–307. doi:10.1002/etc.5620150312

Brethomé, G., 2011. Protection des sols : l'absence de directive européenne coûte cher [WWW Document]. *Actu-Environ.* URL <http://www.actu-environnement.com/ae/news/protection-sol-directive-europenne-bureau-europeen-environnement-13907.php4> (accessed 9.5.16).

Brezna, B., Kweon, O., Stingley, R.L., Freeman, J.P., Khan, A.A., Polek, B., Jones, R.C., Cerniglia, C.E., 2005. Molecular characterization of cytochrome P450 genes in the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 522–532. doi:10.1007/s00253-005-0190-8

Briglia, M., Nurmiaho-Lassila, E.L., Vallini, G., Salkinoja-Salonen, M., 1990. The survival of the pentachlorophenol-degrading *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1 and *Flavobacterium* sp. in natural soil. *Biodegradation* 1, 273–281. doi:10.1007/BF00119764

Brito, J.M.C., Ferreira, D., Guerrero, C. a. C., Machado, A.V., Beltrão, J., 1999. Soil pollution by nitrates using sewage sludge and mineral fertilizers, in: Anac, D., Martin-Prével, P. (Eds.), *Improved Crop Quality by Nutrient Management, Developments in Plant and Soil Sciences*. Springer Netherlands, pp. 223–227. doi:10.1007/978-0-585-37449-9_51

Brosse, N., Dufour, A., Meng, X., Sun, Q., Ragauskas, A., 2012. Miscanthus: a fast-growing crop for biofuels and chemicals production. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 6, 580–598. doi:10.1002/bbb.1353

Brown, G.S., Barton, L.L., Thomson, B.M., 2003. Permanganate oxidation of sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons. *Waste Manag.* 23, 737–740. doi:10.1016/S0956-053X(02)00119-8

Bruand, A., Cousin, I., Nicoullaud, B., Duval, O., Bégon, J.C., 1996. Backscattered Electron Scanning Images of Soil Porosity for Analyzing Soil Compaction around Roots. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60, 895–901. doi:10.2136/sssaj1996.03615995006000030031x

Buffle, J., 1988. *Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach*. Ellis Horwood.

Burke, R., Cairney, J., 2002. Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 12, 105–116. doi:10.1007/s00572-002-0162-0

Busnot, A., Busnot, F., Le Querler, J.F., Yazbeck, J., 1995. Caractérisation de matériel humique, d'origine terrestre de la région Bas-Normande. *Thermochim. Acta* 254, 319–330. doi:10.1016/0040-6031(94)01997-U

CABERNET, 2016. EUGRIS: portal for soil and water management in Europe – Brownfields [WWW Document]. URL http://www.eugris.info/EUGRISmain.asp?EUGRISID=3&Category=Content_Digests (accessed 4.4.16).

- Cabrerizo, A., Dachs, J., Moeckel, C., Ojeda, M.-J., Caballero, G., Barceló, D., Jones, K.C., 2011. Ubiquitous net volatilization of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils and parameters influencing their soil-air partitioning. *Environ. Sci. Technol.* 45, 4740–4747. doi:10.1021/es104131f
- Cajthaml, T., 2006. Bioavailability enhancement with vegetable oil during composting of pah contaminated soil: a case study. Presented at the Proceedings of the International Conference “protection and Restoration of the Environment VIII,” Gidarakos E., Chania, Crete, Greece, p. 6.
- Cajthaml, T., Erbanová, P., Šašek, V., Moeder, M., 2006. Breakdown products on metabolic pathway of degradation of benz[a]anthracene by a ligninolytic fungus. *Chemosphere* 64, 560–564. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.11.034
- Caldini, G., Cenci, G., Manenti, R., Morozzi, G., 1995. The ability of an environmental isolate of *Pseudomonas fluorescens* to utilize chrysene and other four-ring polynuclear aromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 225–229. doi:10.1007/BF00164506
- Calvet, R., 2013. *Le sol*, 2ème édition. ed, FA.ENV.AGRICOLE. France Agricole, Paris.
- Calvet, R., 2003a. *Le sol : propriétés et fonctions Tome 1, Constitution, structure, phénomènes aux interfaces*. France agricole / Dunod, Paris (France).
- Calvet, R., 2003b. *Le sol : propriétés et fonctions Tome 2, Phénomènes physiques et chimiques, applications agronomiques et environnementales*. France agricole / Dunod, Paris (France).
- Camp, P.J., Huber, S.C., Burke, J.J., Moreland, D.E., 1982. Biochemical Changes that Occur during Senescence of Wheat Leaves. *Plant Physiol.* 70, 1641–1646.
- Cappelletto, P., Mongardini, F., Barberi, B., Sannibale, M., Brizzi, M., Pignatelli, V., 2000. Papermaking pulps from the fibrous fraction of *Miscanthus x Giganteus*. *Ind. Crops Prod.* 11, 205–210. doi:10.1016/S0926-6690(99)00051-5
- Carrigg, C., Rice, O., Kavanagh, S., Collins, G., O’Flaherty, V., 2007. DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 955–964. doi:10.1007/s00253-007-1219-y
- Carton, S., Tristant, D., Guibout, F., Lapierre, O., 2008. Intérêt et potentialités de la production de *Miscanthus*. Faisabilité du développement des cultures énergétiques en Ile de France. (Rapport intermédiaire).
- Cases, I., de Lorenzo, V., 2005. Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 105–118. doi:10.1038/nrmicro1084
- Cassidy, M.B., Lee, H., Trevors, J.T., 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. *J. Ind. Microbiol.* 16, 79–101. doi:10.1007/BF01570068
- Cavalieri, E., Mailander, P., Pelfrene, A., 1977. Carcinogenic activity of anthanthrene on mouse skin. *Z. Für Krebsforsch. Klin. Onkol.* 89, 113–118. doi:10.1007/BF00308512

- Cavallo, D., Ursini, C.L., Bavazzano, P., Cassinelli, C., Frattini, A., Perniconi, B., Francesco, A.D., Ciervo, A., Rondinone, B., Iavicoli, S., 2006. Sister Chromatid Exchange and Oxidative DNA Damage in Paving Workers exposed to PAHs. *Ann. Occup. Hyg.* 50, 211–218. doi:10.1093/annhyg/mei072
- Cébron, A., Beguiristain, T., Faure, P., Norini, M.-P., Masfaraud, J.-F., Leyval, C., 2009. Influence of Vegetation on the In Situ Bacterial Community and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Degraders in Aged PAH-Contaminated or Thermal-Desorption-Treated Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6322–6330. doi:10.1128/AEM.02862-08
- Cébron, A., Cortet, J., Criquet, S., Biaz, A., Calvert, V., Caupert, C., Pernin, C., Leyval, C., 2011. Biological functioning of PAH-polluted and thermal desorption-treated soils assessed by fauna and microbial bioindicators. *Res. Microbiol.*, Special issue on environmental microbiology 162, 896–907. doi:10.1016/j.resmic.2011.02.011
- Cébron, A., Norini, M.-P., Beguiristain, T., Leyval, C., 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J. Microbiol. Methods* 73, 148–159. doi:10.1016/j.mimet.2008.01.009
- Cenis, J.L., 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.* 20, 2380.
- Cerezo, M.I., Agustí, S., 2015. PAHs reduce DNA synthesis and delay cell division in the widespread primary producer *Prochlorococcus*. *Environ. Pollut.* 196, 147–155. doi:10.1016/j.envpol.2014.09.023
- Cerniglia, C.E., Gibson, D.T., Dodge, R.H., 1994. Metabolism of benz[a]anthracene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3931–3938.
- Certini, G., Ugolini, F.C., 2013. An updated, expanded, universal definition of soil. *Geoderma* 192, 378–379. doi:10.1016/j.geoderma.2012.07.008
- Chang, B.V., Shiung, L.C., Yuan, S.Y., 2002. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere* 48, 717–724. doi:10.1016/S0045-6535(02)00151-0
- Chen, S.-H., Aitken, M.D., 1999. Salicylate Stimulates the Degradation of High-Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environ. Sci. Technol.* 33, 435–439. doi:10.1021/es9805730
- Chen, Y.-C., Banks, M.K., Schwab, A.P., 2003. Pyrene Degradation in the Rhizosphere of Tall Fescue (*Festuca arundinacea*) and Switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Environ. Sci. Technol.* 37, 5778–5782. doi:10.1021/es030400x
- Chiou, C.T., Sheng, G., Manes, M., 2001. A partition-limited model for the plant uptake of organic contaminants from soil and water. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1437–1444.
- Cho, Y.-G., Rhee, S.-K., Lee, S.-T., 2000. Effect of soil moisture on bioremediation of chlorophenol-contaminated soil. *Biotechnol. Lett.* 22, 915–919. doi:10.1023/A:1005612232079

- Chou, C.-H., 2009. *Miscanthus* plants used as an alternative biofuel material: the basic studies on ecology and molecular evolution. *Renew. Energy* 34, 1908–1912.
- Christian, D.G., Bullard, M.J., Wilkins, C., 1997. The agronomy of some herbaceous crops grown for energy in Southern England. *Asp. Appl. Biol.* 41–51.
- Christian, D.G., Lamphey, J.N.L., Forde, S.M.D., Plumb, R.T., 1994. First report of barley yellow dwarf luteovirus on *Miscanthus* in the United Kingdom. *Eur. J. Plant Pathol.* 100, 167–170.
- Chung, J.-H., Kim, D.-S., 2012. *Miscanthus* as a potential bioenergy crop in East Asia. *J. Crop Sci. Biotechnol.* 15, 65–77.
- CIRC, 2016. Classification des HAP | Cancer et environnement [WWW Document]. URL <http://www.cancer-environnement.fr/317-Classification-des-HAP.ce.aspx> (accessed 4.20.16).
- CITEPA, 2016. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques - HAP [WWW Document]. URL <http://www.citepa.org/fr/air-et-climat/polluants/polluant-organiques-persistants/hydrocarbures-aromatiques-polycycliques> (accessed 4.19.16).
- Clifton-Brown, J.C., Jones, M.B., 1997. The thermal response of leaf extension rate in genotypes of the C4-grass *Miscanthus*: an important factor in determining the potential productivity of different genotypes. *J. Exp. Bot.* 48, 1573–1581. doi:10.1093/jxb/48.8.1573
- Clifton-Brown, J.C., Neilson, B., Lewandowski, I., Jones, M.B., 2000. The modelled productivity of *Miscanthus* × *giganteus* (GREEF et DEU) in Ireland. *Ind. Crops Prod.* 12, 97–109. doi:10.1016/S0926-6690(00)00042-X
- Clifton-brown, J.C., Stampfl, P.F., Jones, M.B., 2004. *Miscanthus* biomass production for energy in Europe and its potential contribution to decreasing fossil fuel carbon emissions. *Glob. Change Biol.* 10, 509–518. doi:10.1111/j.1529-8817.2003.00749.x
- Coates, J.D., Anderson, R.T., Lovley, D.R., 1996. Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons under Sulfate-Reducing Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1099–1101.
- Collura, S., Azambre, B., Finqueneisel, G., Zimny, T., Weber, J.V., 2006. *Miscanthus* × *Giganteus* straw and pellets as sustainable fuels. *Environ. Chem. Lett.* 4, 75–78. doi:10.1007/s10311-006-0036-3
- Colombano, S., Mouvet, C., 2012. Remediation technologies for PAH contaminated soils. France.
- Colombano, S., Saada, V., Guerin, V., Bataillard, P., Bellenfant, G., Beranger, S., Hube, D., Blanc, C., Zornig, C., Girardeau, I., 2010. Quelles techniques pour quels traitements - Analyse coûts-bénéfices (Rapport final BRGM-RP-58609-FR).
- Corgié, S., 2004. Biodégradation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, sélection et dynamique des populations bactériennes dans la rhizosphère en fonction de la distance aux racines. Université Henri Poincaré, Nancy 1.

- Cornelissen, G., Rigterink, H., Ferdinandy, M.M.A., van Noort, P.C.M., 1998. Rapidly Desorbing Fractions of PAHs in Contaminated Sediments as a Predictor of the Extent of Bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 32, 966–970. doi:10.1021/es9704038
- Cousins, I.T., Jones, K.C., 1998. Air–soil exchange of semi-volatile organic compounds (SOCs) in the UK. *Environ. Pollut.* 102, 105–118. doi:10.1016/S0269-7491(98)00069-4
- Covino, S., Svobodová, K., Cvančarová, M., D’Annibale, A., Petruccioli, M., Federici, F., Kresinová, Z., Galli, E., Cajthaml, T., 2010. Inoculum carrier and contaminant bioavailability affect fungal degradation performances of PAH-contaminated solid matrices from a wood preservation plant. *Chemosphere* 79, 855–864. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.02.038
- Crawford, R.L., Mohn, W.W., 1985. Microbiological removal of pentachlorophenol from soil using a *Flavobacterium*. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 617–620. doi:10.1016/0141-0229(85)90031-6
- Criquet, S., Joner, E., Leglize, P., Leyval, C., 2000. Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Biotechnol. Lett.* 22, 1733–1737. doi:10.1023/A:1005604719909
- Crowley, D.E., Brennerova, M.V., Irwin, C., Brenner, V., Focht, D.D., 1996. Rhizosphere effects on biodegradation of 2,5-dichlorobenzoate by a bioluminescent strain of root-colonizing *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20, 79–89. doi:10.1016/0168-6496(96)00015-3
- Cullen, D.W., Hirsch, P.R., 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biol. Biochem.* 30, 983–993. doi:10.1016/S0038-0717(98)00001-7
- Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C., 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.* 56, 55–114.
- Čvančarová, M., Křesinová, Z., Cajthaml, T., 2013. Influence of the bioaccessible fraction of polycyclic aromatic hydrocarbons on the ecotoxicity of historically contaminated soils. *J. Hazard. Mater.* 254–255, 116–124. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.03.060
- Da Silva, M.L., Kamath, R., Alvarez, P.J., 2006. Effect of simulated rhizodeposition on the relative abundance of polynuclear aromatic hydrocarbon catabolic genes in a contaminated soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 386–391.
- Dabestani, R., Ivanov, I.N., 1999. A Compilation of Physical, Spectroscopic and Photophysical Properties of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Photochem. Photobiol.* 70, 10–34. doi:10.1111/j.1751-1097.1999.tb01945.x
- Dahnoun, N., 2013. Evaluation du taux de contamination par les HAP de la faune aux alentours d’un centre à risques : Port de Ghazaouet. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Algérie.
- Dams, R.I., Paton, G., Killham, K., 2007. Bioaugmentation of pentachlorophenol in soil and hydroponic systems. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 60, 171–177. doi:10.1016/j.ibiod.2007.02.006

- Darwent, M.J., Paterson, E., McDonald, A.J.S., Tomos, A.D., 2003. Biosensor reporting of root exudation from *Hordeum vulgare* in relation to shoot nitrate concentration. *J. Exp. Bot.* 54, 325–334. doi:10.1093/jxb/erg017
- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T.A., Qin, W., 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 1, 36–50.
- Davidova, I.A., Gieg, L.M., Duncan, K.E., Suflita, J.M., 2007. Anaerobic phenanthrene mineralization by a carboxylating sulfate-reducing bacterial enrichment. *ISME J.* 1, 436–442. doi:10.1038/ismej.2007.48
- de-Bashan, L.E., Hernandez, J.-P., Bashan, Y., 2012. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. *Appl. Soil Ecol., Microorganisms and the Sustainable Management of Soil* 61, 171–189. doi:10.1016/j.apsoil.2011.09.003
- de Boer, J., Wagelmans, M., 2016. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil—practical options for remediation. *CLEAN—Soil Air Water* 44, 1–6.
- De Sousa, C.A., 2003. Turning brownfields into green space in the City of Toronto. *Landsc. Urban Plan.* 62, 181–198. doi:10.1016/S0169-2046(02)00149-4
- Dean-Ross, D., Moody, J.D., Freeman, J.P., Doerge, D.R., Cerniglia, C.E., 2001. Metabolism of anthracene by a *Rhodococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 205–211. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10886.x
- DEFRA, 2001. Planting and growing *Miscanthus*. Best practice guidelines for applicants to DEFRA's energy crops scheme.
- Demanèche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M., Willison, J.C., Jouanneau, Y., 2004. Identification and Functional Analysis of Two Aromatic-Ring-Hydroxylating Dioxygenases from a *Sphingomonas* Strain That Degrades Various Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6714–6725. doi:10.1128/AEM.70.11.6714-6725.2004
- Dennis, P.G., Miller, A.J., Hirsch, P.R., 2010. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 313–327. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00860.x
- Desalme, D., 2011. Contamination atmosphérique par les hydrocarbures aromatiques polycycliques : toxicité et devenir du phénanthrène dans des systèmes sol-plante-microorganismes. Université de Franche-Comté.
- Desler, C., Johannessen, C., Rasmussen, L.J., 2009. Repair of DNA damage induced by anthanthrene, a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) without bay or fjord regions. *Chem. Biol. Interact.* 177, 212–217. doi:10.1016/j.cbi.2008.10.056
- Di Gennaro, P., Rescalli, E., Galli, E., Sello, G., Bestetti, G., 2001. Characterization of *Rhodococcus opacus* R7, a strain able to degrade naphthalene and o-xylene isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Res. Microbiol.* 152, 641–651.

- Diamond, S.A., Oris, J.T., Guttman, S.I., 1995. Adaptation to fluoranthene exposure in a laboratory population of fathead minnows. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1393–1400. doi:10.1002/etc.5620140816
- Díaz-Gómez, R., Toledo-Araya, H., López-Solís, R., Obreque-Slier, E., 2014. Combined effect of gallic acid and catechin against *Escherichia coli*. *LWT-Food Sci. Technol.* 59, 896–900.
- Dietz, A.C., Schnoor, J.L., 2001. Advances in phytoremediation. *Environ. Health Perspect.* 109, 163–168.
- Ding, G.-C., Heuer, H., Zühlke, S., Spiteller, M., Pronk, G.J., Heister, K., Kögel-Knabner, I., Smalla, K., 2010. Soil Type-Dependent Responses to Phenanthrene as Revealed by Determining the Diversity and Abundance of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Ring-Hydroxylating Dioxygenase Genes by Using a Novel PCR Detection System. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4765–4771. doi:10.1128/AEM.00047-10
- Ding, Y.S., Yan, X.J., Jain, R.B., Lopp, E., Tavakoli, A., Polzin, G.M., Stanfill, S.B., Ashley, D.L., Watson, C.H., 2006. Determination of 14 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mainstream Smoke from U.S. Brand and Non-U.S. Brand Cigarettes. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1133–1138. doi:10.1021/es0517320
- Directive 98/83/CE, 1998. Directive 98/83/CE du conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.
- Dix, N.J., 1979. Inhibition of fungi by gallic acid in relation to growth on leaves and litter. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 73, 329–336. doi:10.1016/S0007-1536(79)80117-5
- Dohleman, F.G., Long, S.P., 2009. More Productive Than Maize in the Midwest: How Does *Miscanthus* Do It? *Plant Physiol.* 150, 2104–2115. doi:10.1104/pp.109.139162
- Doty, S.L., 2008. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytol.* 179, 318–333.
- Dou, J., Liu, X., Ding, A., 2009. Anaerobic degradation of naphthalene by the mixed bacteria under nitrate reducing conditions. *J. Hazard. Mater.* 165, 325–331. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.10.002
- Doyle, E., Muckian, L., Hickey, A.M., Clipson, N., 2008. Chapter 2 Microbial PAH Degradation, in: Allen I. Laskin, S.S. and G.M.G. (Ed.), *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 27–66.
- Drénou, C., 2006. Les racines: face cachée des arbres. Institut pour le développement forestier, Paris.
- Duchaufour, P., 2001. Introduction à la science du sol : sol, végétation, environnement, 6ème édition. ed, Sciences sup. Dunod, Paris (France).
- Dufossé, K., Drewer, J., Gabrielle, B., Drouet, J.-L., 2014. Effects of a 20-year old *Miscanthus × giganteus* stand and its removal on soil characteristics and greenhouse gas emissions. *Biomass Bioenergy* 69, 198–210. doi:10.1016/j.biombioe.2014.07.003

- Dunning Hotopp, J.C., Hausinger, R.P., 2001. Alternative substrates of 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 15, 155–162. doi:10.1016/S1381-1177(01)00018-2
- Dyremark, A., Westerholm, R., Övervik, E., Gustavsson, J.-Å., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from charcoal grilling. *Atmos. Environ.* 29, 1553–1558. doi:10.1016/1352-2310(94)00357-Q
- Eapen, S., Singh, S., D’Souza, S.F., 2007. Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnol. Adv.* 25, 442–451. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.05.001
- Edwards, D.A., Luthy, R.G., Liu, Z., 1991. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. *Environ. Sci. Technol.* 25, 127–133. doi:10.1021/es00013a014
- Edwards, N.T., 1983. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH’s) in the Terrestrial Environment—A Review. *J. Environ. Qual.* 12, 427–441. doi:10.2134/jeq1983.00472425001200040001x
- Edwards, N.T., Ross-Todd, B.M., Garver, E.G., 1982. Uptake and metabolism of ¹⁴C anthracene by soybean (*Glycine max*). *Environ. Exp. Bot.* 22, 349–357. doi:10.1016/0098-8472(82)90027-2
- England, L.S., Lee, H., Trevors, J.T., 1993. Bacterial survival in soil: Effect of clays and protozoa. *Soil Biol. Biochem.* 25, 525–531. doi:10.1016/0038-0717(93)90189-I
- Eom, I.C., Rast, C., Veber, A.M., Vasseur, P., 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 190–205. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.12.020
- Esen, F., Tasdemir, Y., Vardar, N., 2008. Atmospheric concentrations of PAHs, their possible sources and gas-to-particle partitioning at a residential site of Bursa, Turkey. *Atmospheric Res.* 88, 243–255. doi:10.1016/j.atmosres.2007.11.022
- Ezezika, O.C., Singer, P.A., 2010. Genetically engineered oil-eating microbes for bioremediation: Prospects and regulatory challenges. *Technol. Soc.* 32, 331–335. doi:10.1016/j.techsoc.2010.10.010
- Fang, C., Radosevich, M., Fuhrmann, J.J., 2001. Atrazine and phenanthrene degradation in grass rhizosphere soil. *Soil Biol. Biochem.* 33, 671–678. doi:10.1016/S0038-0717(00)00216-9
- Farrar, J., Hawes, M., Jones, D., Lindow, S., 2003. How Roots Control the Flux of Carbon to the Rhizosphere. *Ecology* 84, 827–837. doi:10.1890/0012-9658(2003)084[0827:HRCTFO]2.0.CO;2
- Faugier, A., 2010. Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs minoritaires “the rare biosphere” (phdthesis). Ecole Centrale de Lyon.

- Fernandez-Astorga, A., Muela, A., Cisterna, R., Iriberry, J., Barcina, I., 1992. Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 392–398.
- Fernando, A.L., Godovikova, V., Oliveira, J.F.S., 2004. *Miscanthus x Giganteus*: Contribution to a Sustainable Agriculture of a Future/Present - Oriented Biomaterial. *Mater. Sci. Forum* 455–456, 437–441. doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.455-456.437
- Ferro, A.M., Sims, R.C., Bugbee, B., 1994. Hycrest crested wheatgrass accelerates the degradation of pentachlorophenol in soil. *J. Environ. Qual.* 23, 272–279.
- Festa, S., Coppotelli, B.M., Morelli, I.S., 2016. Comparative bioaugmentation with a consortium and a single strain in a phenanthrene-contaminated soil: Impact on the bacterial community and biodegradation. *Appl. Soil Ecol.* 98, 8–19. doi:10.1016/j.apsoil.2015.08.025
- Field, J.A., Jong, E. de, Costa, G.F., Bont, J.A. de, 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2219–2226.
- Figala, J., Vranová, V., Rejšek, K., Formánek, P., 2015. Giant miscanthus (*Miscanthus x Giganteus* Greef Et Deu.) – A Promising Plant for Soil Remediation: A Mini Review. *ResearchGate* 63, 2241–2246. doi:10.11118/201563062241
- Filonov, A.E., Akhmetov, L.I., Puntus, I.F., Esikova, T.Z., Gafarov, A.B., Izmalkova, T.Y., Sokolov, S.L., Kosheleva, I.A., Boronin, A.M., 2005. The Construction and Monitoring of Genetically Tagged, Plasmid-Containing, Naphthalene-Degrading Strains in Soil. *Microbiology* 74, 453–458. doi:10.1007/s11021-005-0088-6
- Finvers, M.A., 2008. Application of e2DPSIR for analysis of soil protection issues and an assessment of British Columbia's soil protection legislation. Cranfield University, UK.
- Firmin, S., Labidi, S., Fontaine, J., Laruelle, F., Tisserant, B., Nsanganwimana, F., Pourrut, B., Dalpé, Y., Grandmougin, A., Douay, F., Shirali, P., Verdin, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2015. Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation protects *Miscanthus x giganteus* against trace element toxicity in a highly metal-contaminated site. *Sci. Total Environ.* 527–528, 91–99. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.04.116
- Fismes, J., Perrin-Ganier, C., Empereur-Bissonnet, P., Morel, J.L., 2002. Soil-to-Root Transfer and Translocation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Vegetables Grown on Industrial Contaminated Soils. *J. Environ. Qual.* 31, 1649–1656. doi:10.2134/jeq2002.1649
- Forsyth, J.V., Tsao, Y.M., Bleam, R.D., 1995. Bioremediation: When is augmentation needed?
- Fortin, N., Beaumier, D., Lee, K., Greer, C.W., 2004. Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. *J. Microbiol. Methods* 56, 181–191. doi:10.1016/j.mimet.2003.10.006
- Frick, C.M., Germida, J.J., Farrell, R.E., 1999. Assessment of phytoremediation as an in-situ technique for cleaning oil-contaminated sites, in: *Technical Seminar on Chemical Spills*. Environment Canada; 1998, p. 105a–124a.

- Friedrich, M., Grosser, R.J., Kern, E.A., Inskeep, W.P., Ward, D.M., 2000. Effect of Model Sorptive Phases on Phenanthrene Biodegradation: Molecular Analysis of Enrichments and Isolates Suggests Selection Based on Bioavailability. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2703–2710. doi:10.1128/AEM.66.7.2703-2710.2000
- Frostegård, Å., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Gall, F.L., Jeannin, P., Nesme, X., Simonet, P., 1999. Quantification of Bias Related to the Extraction of DNA Directly from Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5409–5420.
- Gan, S., Lau, E.V., Ng, H.K., 2009. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J. Hazard. Mater.* 172, 532–549. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.07.118
- Gao, Y., Ren, L., Ling, W., Gong, S., Sun, B., Zhang, Y., 2010. Desorption of phenanthrene and pyrene in soils by root exudates. *Bioresour. Technol.* 101, 1159–1165. doi:10.1016/j.biortech.2009.09.062
- Gao, Y., Yu, X.Z., Wu, S.C., Cheung, K.C., Tam, N.F.Y., Qian, P.Y., Wong, M.H., 2006. Interactions of rice (*Oryza sativa* L.) and PAH-degrading bacteria (*Acinetobacter* sp.) on enhanced dissipation of spiked phenanthrene and pyrene in waterlogged soil. *Sci. Total Environ.* 372, 1–11. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.09.029
- García-Delgado, C., Alfaro-Barta, I., Eymar, E., 2015. Combination of biochar amendment and mycoremediation for polycyclic aromatic hydrocarbons immobilization and biodegradation in creosote-contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 285, 259–266. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.12.002
- Garon, D., Krivobok, S., Seigle-Murandi, F., 2000. Fungal degradation of fluorene. *Chemosphere* 40, 91–97. doi:10.1016/S0045-6535(99)00250-7
- Garon, D., Sage, L., Wouessidjewe, D., Seigle-Murandi, F., 2004. Enhanced degradation of fluorene in soil slurry by *Absidia cylindrospora* and maltosyl-cyclodextrin. *Chemosphere* 56, 159–166. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.02.019
- Gaskin, S., 2008. Rhizoremediation of hydrocarbon contaminated soil using Australian native grasses (Electronic Thesis or Dissertation). Flinders University, Australia.
- Gauthier, G., Somer, L., 2013. Guide pratique de la culture de *Miscanthus*.
- Gerhardt, K.E., Huang, X.-D., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Sci.* 176, 20–30. doi:10.1016/j.plantsci.2008.09.014
- Germaine, K., Keogh, E., Garcia-Cabellos, G., Borremans, B., Lelie, D. van der, Barac, T., Oeyen, L., Vangronsveld, J., Moore, F.P., Moore, E.R.B., Campbell, C.D., Ryan, D., Dowling, D.N., 2004. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 109–118. doi:10.1016/j.femsec.2003.12.009
- Ghaly, A., Yusran, A., Dave, D., 2013. Effects of Biostimulation and Bioaugmentation on The Degradation of Pyrene in Soil. *J. Bioremediation Biodegrad.* S5.

- Gibson, D.T., Mahadevan, V., Jerina, D.M., Yogi, H., Yeh, H.J., 1975. Oxidation of the carcinogens benzo [a] pyrene and benzo [a] anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science* 189, 295–297.
- Gilbert, E.S., Crowley, D.E., 1997. Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1933–1938.
- Gilbert, G.S., Clayton, M.K., Handelsman, J., Parke, J.L., 1996. Use of cluster and discriminant analyses to compare rhizosphere bacterial communities following biological perturbation. *Microb. Ecol.* 32, 123–147.
- Girard, M.-C., Walter, C., Rémy, J.-C., Berthelin, J., Morel, J.-L., 2005. *Sols et environnement : cours, exercices et études de cas*, Sciences sup. Dunod, Paris (France).
- Glaser, J.A., 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* 18, 62–63.
- Glasier, G.F., Filfil, R., Pacey, P.D., 2001. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons coincident with pyrolytic carbon deposition. *Carbon* 39, 497–506. doi:10.1016/S0008-6223(00)00156-1
- Gobat, J.-M., Aragno, M., Matthey, W., 2010. *Le sol vivant : bases de pédologie, biologie des sols*, 3ème édition revue et augmentée. ed, Science & ingénierie de l’environnement. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.
- Godoi, A.F.L., Ravindra, K., Godoi, R.H.M., Andrade, S.J., Santiago-Silva, M., Van Vaeck, L., Van Grieken, R., 2004. Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning. *J. Chromatogr. A*, 26th International Symposium on Capillary Chromatography and Electrophoresis 1027, 49–53. doi:10.1016/j.chroma.2003.10.048
- González-Paredes, Y., Alarcón, A., Alarcón, R., Almaraz Juan, J., Martínez-Romero, E., Cruz-Sánchez Jesús, S., Mendoza-López Ma, R., Ormeño-Orrillo, E., 2013. Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzo[a]pyrene by *Rhizobium tropici* CIAT 899 in liquid culture medium. *Appl. Soil Ecol.* 63, 105–111. doi:10.1016/j.apsoil.2012.09.010
- Graham, J.H., Leonard, R.T., Menge, J.A., 1981. Membrane-Mediated Decrease in Root Exudation Responsible for Phosphorus Inhibition of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Formation. *Plant Physiol.* 68, 548–552.
- Gramss, G., Kirsche, B., Voigt, K.-D., Günther, T., Fritsche, W., 1999a. Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. *Mycol. Res.* 103, 1009–1018. doi:10.1017/S0953756298008144
- Gramss, G., Voigt, K.-D., Kirsche, B., 1999b. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. *Biodegradation* 10, 51–62. doi:10.1023/A:1008368923383
- Gras, R., 1994. *Sols caillouteux et production végétale*. Editions Quae.

Gray, J.P., Herwig, R.P., 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4049–4059.

Grayston, S.J., Vaughan, D., Jones, D., 1997. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl. Soil Ecol.* 5, 29–56. doi:10.1016/S0929-1393(96)00126-6

Grimberg, S.J., Stringfellow, W.T., Aitken, M.D., 1996. Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a nonionic surfactant. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2387–2392.

Grundy, M.M., Moore, M.N., Howell, S.M., Ratcliffe, N.A., 1996. Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 34, 273–290. doi:10.1016/0166-445X(95)00044-5

Gu, M.B., Chang, S.T., 2001. Soil biosensor for the detection of PAH toxicity using an immobilized recombinant bacterium and a biosurfactant. *Biosens. Bioelectron.* 16, 667–674. doi:10.1016/S0956-5663(01)00230-5

Guckert, A., Breisch, H., Reisinger, O., 1975. Interface sol-racine—I. *Soil Biol. Biochem.* 7, 241–250. doi:10.1016/0038-0717(75)90061-9

Guerin, T.F., 1999. The extraction of aged polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) residues from a clay soil using sonication and a Soxhlet procedure: a comparative study. *J. Environ. Monit. JEM* 1, 63–67.

Guha, S., Jaffé, P.R., 1996. Biodegradation Kinetics of Phenanthrene Partitioned into the Micellar Phase of Nonionic Surfactants. *Environ. Sci. Technol.* 30, 605–611. doi:10.1021/es950385z

Günther, T., Dornberger, U., Fritsche, W., 1996. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 33, 203–215. doi:10.1016/0045-6535(96)00164-6

Guthrie, E.A., Bortiatynski, J.M., van Heemst, J.D.H., Richman, J.E., Hardy, K.S., Kovach, E.M., Hatcher, P.G., 1999. Determination of [¹³C]Pyrene Sequestration in Sediment Microcosms Using Flash Pyrolysis–GC–MS and ¹³C NMR. *Environ. Sci. Technol.* 33, 119–125. doi:10.1021/es980515e

Haluška, L., Ůbor, Barančíková, G., Baláž, Š., Dercová, K., Vrana, B., Paz-Weisshaar, M., Furčíová, E., Bielek, P., 1995. Degradation of PCB in different soils by inoculated *Alcaligenes xylosoxidans*. *Sci. Total Environ.* 175, 275–285. doi:10.1016/0048-9697(95)04927-4

Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadžianas, L., Aoyama, I., Jedidi, N., 2007. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biol. Biochem.* 39, 1926–1935. doi:10.1016/j.soilbio.2007.02.008

Han, M., Kim, Y., Koo, B., Choi, G.-W., 2011. Bioethanol production by *Miscanthus* as an lignocellulosic biomass: focus on high efficient conversion to glucose and ethanol. *BioResources* 6, 1939–1953. doi:10.15376/biores.6.2.1939-1953

Hansen, D.J., DiToro, D.M., McGrath, J.A., Swartz, R.C., Mount, D.R., Spehar, R.L., Burgess, R.M., Ozretich, R.J., Bell, H.E., Linton, T.K., 2003. Procedures for the Derivation of Equilibrium Partitioning Sediment Benchmarks (ESBs) for the Protection of Benthic Organisms: PAH Mixtures.

Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1–15. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.03.137

Harris, K., Young, I.M., Gilligan, C.A., Otten, W., Ritz, K., 2003. Effect of bulk density on the spatial organisation of the fungus *Rhizoctonia solani* in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 45–56. doi:10.1111/j.1574-6941.2003.tb01089.x

Harry, M., Gambier, B., Bourezgui, Y., Garnier-Sillam, E., 1999. Evaluation of purification procedures for DNA extracted from rich organic samples: interference with humic substances. *Analusis* 27, 439–441.

Hartley, W., Dickinson, N.M., Riby, P., Lepp, N.W., 2009. Arsenic mobility in brownfield soils amended with green waste compost or biochar and planted with *Miscanthus*. *Environ. Pollut.* 157, 2654–2662. doi:10.1016/j.envpol.2009.05.011

Hartmann, A., Rothballer, M., Schmid, M., 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 312, 7–14. doi:10.1007/s11104-007-9514-z

Hartwig, A., 2012. Benzo[a]anthracene [MAK Value Documentation, 2012], in: The MAK-Collection for Occupational Health and Safety. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Hatzinger, P.B., Alexander, M., 1997. Biodegradation of organic compounds sequestered in organic solids or in nanopores within silica particles. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2215–2221. doi:10.1002/etc.5620161103

He, L., Song, J., Peng, P., 'an, 2008. Characterization of extractable and non-extractable polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and sediments from the Pearl River Delta, China. *Environ. Pollut.* 156, 769–774. doi:10.1016/j.envpol.2008.06.003

Heaton, E.A., Dohleman, F.G., Miguez, A.F., Juvik, J.A., Lozovaya, V., Widholm, J., Zabolina, O.A., Gregory, M., Mcisaac, F., David, M.B., Voigt, T.B., Boersma, N.N., Long, S.P., 2010. *Miscanthus*: A promising biomass crop. *Adv. Bot. Res.* 56, 137.

Heinaru, E., Merimaa, M., Viggor, S., Lehist, M., Leito, I., Truu, J., Heinaru, A., 2005. Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted area. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51, 363–373. doi:10.1016/j.femsec.2004.09.009

Heinrich, D., Hess, D., 1985. Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants. *Can. J. Microbiol.* 31, 26–31. doi:10.1139/m85-007

- Henner, P., Schiavon, M., Druelle, V., Lichtfouse, E., 1999. Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Org. Geochem.* 30, 963–969. doi:10.1016/S0146-6380(99)00080-7
- Herren, R.V., 2011. *The Science of Agriculture: A Biological Approach*. Cengage Learning.
- Hervé, M., 2016. *Aide-mémoire de statistique appliquée à la biologie*.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., Peterson, S.B., 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 15–25. doi:10.1038/nrmicro2259
- Himken, M., Lammel, J., Neukirchen, D., Czepionka-Krause, U., Ols, H.-W., 1997. Cultivation of *Miscanthus* under West European conditions: Seasonal changes in dry matter production, nutrient uptake and remobilization. *Plant Soil* 189, 117–126. doi:10.1023/A:1004244614537
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., Jaillard, B., 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant Soil* 248, 43–59. doi:10.1023/A:1022371130939
- Hodkinson, T.R., Chase, M.W., Lledó, M.D., Salamin, N., Renvoize, S.A., 2002. Phylogenetics of *Miscanthus*, *Saccharum* and related genera (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL intron and trnL-F intergenic spacers. *J. Plant Res.* 115, 381–92. doi:10.1007/s10265-002-0049-3
- Hoffland, E., 1992. Quantitative Evaluation of the Role of Organic Acid Exudation in the Mobilization of Rock Phosphate by Rape. *ResearchGate* 140, 279–289. doi:10.1007/BF00010605
- Hofman, J., Hovorková, I., Semple, K.T., 2014. The variability of standard artificial soils: Behaviour, extractability and bioavailability of organic pollutants. *J. Hazard. Mater.* 264, 514–520. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.10.039
- Hofrichter, M., 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol., Recent Advances in Lignin Biodegradation* 30, 454–466. doi:10.1016/S0141-0229(01)00528-2
- Holben, W.E., Jansson, J.K., Chelm, B.K., Tiedje, J.M., 1988. DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 703–711.
- Hollender, J., Koch, B., Lutermann, C., Dott, W., 2003. Efficiency of Different Methods and Solvents for the Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Soils. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 83, 21–32. doi:10.1080/0306731021000050723
- Holme, I.B., Petersen, K.K., 1996. Callus induction and plant regeneration from different explant types of *Miscanthus x ogiformis* Honda “Giganteus.” *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 45, 43–52. doi:10.1007/BF00043427

- Hosokawa, R., Nagai, M., Morikawa, M., Okuyama, H., 2009. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1519–1528. doi:10.1007/s11274-009-0044-0
- Howeler, M., Ghiorse, W.C., Walker, L.P., 2003. A quantitative analysis of DNA extraction and purification from compost. *J. Microbiol. Methods* 54, 37–45. doi:10.1016/S0167-7012(03)00006-X
- Howsam, M., Jones, K.C., Ineson, P., 2000. PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. I — Concentrations and profiles. *Environ. Pollut.* 108, 413–424. doi:10.1016/S0269-7491(99)00195-5
- Hoyer, P.B., 2001. Reproductive toxicology: current and future directions1. *Biochem. Pharmacol.* 62, 1557–1564. doi:10.1016/S0006-2952(01)00814-0
- Hromádka, L., Vranová, V., Techer, D., Laval-Gilly, P., Rejšek, K., Formánek, P., Falla, J., 2010. Composition of root exudates of *Miscanthus x giganteus* Greef Et Deu. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun.* 58, 71–76.
- Huang, X.-D., El-Alawi, Y., Penrose, D.M., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2004. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environ. Pollut.* 130, 465–476. doi:10.1016/j.envpol.2003.09.031
- Huang, X.-F., Chaparro, J.M., Reardon, K.F., Zhang, R., Shen, Q., Vivanco, J.M., 2014. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany* 92, 267–275. doi:10.1139/cjb-2013-0225
- Huberman, J.A., Kornberg, A., Alberts, B.M., 1971. Stimulation of T4 bacteriophage DNA polymerase by the protein product of T4 gene 32. *J. Mol. Biol.* 62, 39–52. doi:10.1016/0022-2836(71)90129-X
- Hyman, M., Dupont, R.R., 2001. Groundwater and soil remediation: process design and cost estimating of proven technologies. ASCE Press, Reston, Va.
- Iij, R.L.T., 1980. Microbial Oxidation of Organic Matter of Histosols, in: Alexander, M. (Ed.), *Advances in Microbial Ecology*, Advances in Microbial Ecology. Springer US, pp. 169–201. doi:10.1007/978-1-4615-8291-5_5
- Iijima, M., Griffiths, B., Bengough, A.G., 2000. Sloughing of cap cells and carbon exudation from maize seedling roots in compacted sand. *New Phytol.* 145, 477–482. doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00595.x
- Il'nitsky, A.P., Mischenko, V.S., Shabad, L.M., 1977. New data on volcanoes as natural sources of carcinogenic substances. *Cancer Lett.* 3, 227–230. doi:10.1016/S0304-3835(77)95919-5
- INERIS, 2006. Rapport HAP, Données technico-économiques sur les substances chimiques en France.

INERIS, 2005. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques Guide méthodologique Acquisition des données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines (Rapport d'étude No. 66244-NaN-R01).

ISO 29200, 2013. Soil quality - Assessment of genotoxic effects on higher plants - *Vicia faba* micronucleus test.

Itoh, N., Numata, M., Aoyagi, Y., Yarita, T., 2008. Comparison of low-level polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment revealed by Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction, and pressurized liquid extraction. *Anal. Chim. Acta* 612, 44–52. doi:10.1016/j.aca.2008.02.012

Iwamoto, T., Nasu, M., 2001. Current bioremediation practice and perspective. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 1–8. doi:10.1016/S1389-1723(01)80190-0

Jacques, R.J.S., Okeke, B.C., Bento, F.M., Teixeira, A.S., Peralba, M.C.R., Camargo, F.A.O., 2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresour. Technol.* 99, 2637–2643. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.047

Jaeger, C.H., Lindow, S.E., Miller, W., Clark, E., Firestone, M.K., 1999. Mapping of Sugar and Amino Acid Availability in Soil around Roots with Bacterial Sensors of Sucrose and Tryptophan. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2685–2690.

Jannasch, H.W., Eimhjellen, K., Wirsen, C. O, Farmanfarmalan, A., 1971. Microbial Degradation of Organic Matter in the Deep Sea. *Science* 171, 672–675. doi:10.1126/science.171.3972.672

Jerina, D.M., Van Bladeren, P.J., Yagi, H., Gibson, D.T., Mahadevan, V., Neese, A.S., Koreeda, M., Sharma, N.D., Boyd, D.R., 1984. Synthesis and absolute configuration of the bacterial cis-1,2-, cis-8,9-, and cis-10,11-dihydro diol metabolites of benz[a]anthracene formed by strain of *Beijerinckia*. *J. Org. Chem.* 49, 3621–3628. doi:10.1021/jo00193a033

Jia, H., Lu, H., Liu, J., Li, J., Dai, M., Yan, C., 2015. Effects of root exudates on the leachability, distribution, and bioavailability of phenanthrene and pyrene from mangrove sediments. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* doi:10.1007/s11356-015-5772-0

Jiao, X.C., Xu, F.L., Dawson, R., Chen, S.H., Tao, S., 2007. Adsorption and absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to rice roots. *Environ. Pollut.* 148, 230–235. doi:10.1016/j.envpol.2006.10.025

Jingguo, W., Bakken, L.R., 1997. Competition for nitrogen during decomposition of plant residues in soil: Effect of spatial placement of N-rich and N-poor plant residues. *Soil Biol. Biochem.* 29, 153–162. doi:10.1016/S0038-0717(96)00291-X

Jocteur Monrozier, L., Duchaufour, P., 1986. Données récentes sur l'humification. *Sci. Sol* 24, 377–388.

Johannes Sørensen, S., Schyberg, T., Rønn, R., 1999. Predation by protozoa on *Escherichia coli* K12 in soil and transfer of resistance plasmid RP4 to indigenous bacteria in soil. *Appl. Soil Ecol.* 11, 79–90. doi:10.1016/S0929-1393(98)00117-6

- Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* 133, 71–84. doi:10.1016/j.envpol.2004.04.015
- Johnson, C.R., Scow, K.M., 1999. Effect of nitrogen and phosphorus addition on phenanthrene biodegradation in four soils. *Biodegradation* 10, 43–50. doi:10.1023/A:1008359606545
- Johnson, M., Tucker, N., Barnes, S., Kirwan, K., 2005. Improvement of the impact performance of a starch based biopolymer via the incorporation of *Miscanthus giganteus* fibres. *Ind. Crops Prod.* 22, 175–186. doi:10.1016/j.indcrop.2004.08.004
- Joner, E.J., Hirmann, D., Szolar, O.H.J., Todorovic, D., Leyval, C., Loibner, A.P., 2004. Priming effects on PAH degradation and ecotoxicity during a phytoremediation experiment. *Environ. Pollut.* 128, 429–435. doi:10.1016/j.envpol.2003.09.005
- Joner, E.J., Leyval, C., 2003. Rhizosphere Gradients of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Dissipation in Two Industrial Soils and the Impact of Arbuscular Mycorrhiza. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2371–2375. doi:10.1021/es020196y
- Jones, K.D., Tiller, C.L., 1999. Effect of Solution Chemistry on the Extent of Binding of Phenanthrene by a Soil Humic Acid: A Comparison of Dissolved and Clay Bound Humic. *Environ. Sci. Technol.* 33, 580–587. doi:10.1021/es9803207
- Jordahl, J.L., Foster, L., Schnoor, J.L., Alvarez, P.J.J., 1997. Effect of hybrid poplar trees on microbial populations important to hazardous waste bioremediation. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1318–1321. doi:10.1002/etc.5620160630
- Jørgensen, U., 1997. Biomass Quality for Power Production Genotypic variation in dry matter accumulation and content of N, K and Cl in *Miscanthus* in Denmark. *Biomass Bioenergy* 12, 155–169. doi:10.1016/S0961-9534(97)00002-0
- Jouanneau, Y., Meyer, C., 2006. Purification and characterization of an arene cis-dihydrodiol dehydrogenase endowed with broad substrate specificity toward polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiols. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4726–4734. doi:10.1128/AEM.00395-06
- Jouanneau, Y., Meyer, C., Jakoncic, J., Stojanoff, V., Gaillard, J., 2006. Characterization of a Naphthalene Dioxygenase Endowed with an Exceptionally Broad Substrate Specificity toward Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 12380–12391. doi:10.1021/bi0611311
- Jouannin, F., 2004. Etude de la mobilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) contenus dans un sol industriel pollué. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Lyon.
- Juhasz, A. I., Britz, M. I., Stanley, G. a., 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*. *J. Appl. Microbiol.* 83, 189–198. doi:10.1046/j.1365-2672.1997.00220.x

- Juhasz, A.L., Naidu, R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 45, 57–88. doi:10.1016/S0964-8305(00)00052-4
- Juhasz, A.L., Stanley, G.A., Britz, M.L., 2002. Metabolite repression inhibits degradation of benzo[a]pyrene and dibenz[a,h]anthracene by *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,003. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 88–96.
- Juhasz, A.L., Stanley, G.A., Britz, M.L., 2000. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 396–401.
- Junninen, H., Mønster, J., Rey, M., Cancelinha, J., Douglas, K., Duane, M., Forcina, V., Müller, A., Lagler, F., Marelli, L., Borowiak, A., Niedzialek, J., Paradiz, B., Mira-Salama, D., Jimenez, J., Hansen, U., Astorga, C., Stanczyk, K., Viana, M., Querol, X., Duvall, R.M., Norris, G.A., Tsakovski, S., Wåhlin, P., Horák, J., Larsen, B.R., 2009. Quantifying the Impact of Residential Heating on the Urban Air Quality in a Typical European Coal Combustion Region. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7964–7970. doi:10.1021/es8032082
- Kai, M., Vespermann, A., Piechulla, B., 2008. The growth of fungi and *Arabidopsis thaliana* is influenced by bacterial volatiles. *Plant Signal. Behav.* 3, 482–484.
- Kalantary, R.R., Mohseni-Bandpi, A., Esrafil, A., Nasser, S., Ashmagh, F.R., Jorfi, S., Ja'fari, M., 2014. Effectiveness of biostimulation through nutrient content on the bioremediation of phenanthrene contaminated soil. *J. Environ. Health Sci. Eng.* 12. doi:10.1186/s40201-014-0143-1
- Kamath, R., Schnoor, J.L., Alvarez, P.J.J., 2004. Effect of root-derived substrates on the expression of *nah-lux* genes in *Pseudomonas fluorescens* HK44: implications for PAH biodegradation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1740–1745.
- Karamalidis, A.K., Evangelou, A.C., Karabika, E., Koukkou, A.I., Drainas, C., Voudrias, E.A., 2010. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. *Bioresour. Technol.* 101, 6545–6552. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.055
- Kathi, S., Khan, A.B., 2011. Phytoremediation Approaches to PAH Contaminated Soil. *Indian J. Sci. Technol.* 4, 56–63. doi:10.17485/ijst/2011/v4i1/29935
- Kaye, J.P., Hart, S.C., 1997. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends Ecol. Evol.* 12, 139–143. doi:10.1016/S0169-5347(97)01001-X
- Kelley, I., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E., 1990. Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a *Mycobacterium* sp. *Biodegradation* 1, 283–290. doi:10.1007/BF00119765
- Kelsey, J.W., Kottler, B.D., Alexander, M., 1997. Selective Chemical Extractants To Predict Bioavailability of Soil-Aged Organic Chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 31, 214–217. doi:10.1021/es960354j

- Kennedy, T.A., Naeem, S., Howe, K.M., Knops, J.M.H., Tilman, D., Reich, P., 2002. Biodiversity as a barrier to ecological invasion. *Nature* 417, 636–638. doi:10.1038/nature00776
- Khan, F.I., Husain, T., Hejazi, R., 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.* 71, 95–122. doi:10.1016/j.jenvman.2004.02.003
- Kibbe, W.A., 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 35, W43–46. doi:10.1093/nar/gkm234
- Kim, E.-J., Oh, J.-E., Chang, Y.-S., 2003. Effects of forest fire on the level and distribution of PCDD/Fs and PAHs in soil. *Sci. Total Environ.* 311, 177–189. doi:10.1016/S0048-9697(03)00095-0
- Kim, H.S., Zhang, G., Juvik, J.A., Widholm, J.M., 2010. *Miscanthus x giganteus* plant regeneration: effect of callus types, ages and culture methods on regeneration competence. *GCB Bioenergy* 2, 192–200. doi:10.1111/j.1757-1707.2010.01054.x
- Kim, J.H., Stansbury, K.H., Walker, N.J., Trush, M.A., Strickland, P.T., Sutter, T.R., 1998. Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis* 19, 1847–1853. doi:10.1093/carcin/19.10.1847
- Kipopoulou, A.M., Manoli, E., Samara, C., 1999. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. *Environ. Pollut.* 106, 369–380. doi:10.1016/S0269-7491(99)00107-4
- Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R., Schmidt, T.M., 2001. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res.* 29, 181–184. doi:10.1093/nar/29.1.181
- Knee, E.M., Gong, F.C., Gao, M., Teplitski, M., Jones, A.R., Foxworthy, A., Mort, A.J., Bauer, W.D., 2001. Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 14, 775–784. doi:10.1094/MPMI.2001.14.6.775
- Kögel-Knabner, I., Totsche, K.U., 1998. Influence of dissolved and colloidal phase humic substances on the transport of hydrophobic organic contaminants in soils. *Phys. Chem. Earth* 23, 179–185. doi:10.1016/S0079-1946(98)00010-X
- Kong, H., Sun, R., Gao, Y., Sun, B., 2013. Elution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil Columns Using Low-Molecular-Weight Organic Acids. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 77, 72–82. doi:10.2136/sssaj2012.0203
- Korzeniowska, J., Stanislawski-Glubiak, E., 2015. Phytoremediation potential of *Miscanthus x giganteus* and *Spartina pectinata* in soil contaminated with heavy metals. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 11648–11657. doi:10.1007/s11356-015-4439-1
- Kotterman, M.J.J., Vis, E.H., Field, J.A., 1998. Successive Mineralization and Detoxification of Benzo[a]pyrene by the White Rot Fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55 and Indigenous Microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2853–2858.

- Kottler, B.D., Alexander, M., 2001. Relationship of properties of polycyclic aromatic hydrocarbons to sequestration in soil. *Environ. Pollut.* 113, 293–298. doi:10.1016/S0269-7491(00)00189-5
- Kouzayha, A., 2011. Développement des méthodes analytiques pour la détection de la quantification de traces des HAP et de pesticides dans l'eau. Application à l'évaluation de la qualité des eaux libanaises. Université de Bordeaux 1, Bordeaux, France.
- Kraus, J.J., Munir, I.Z., McEldoon, J.P., Clark, D.S., Dordick, J.S., 1999. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons catalyzed by soybean peroxidase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 80, 221–230. doi:10.1385/ABAB:80:3:221
- Krauss, M., Wilcke, W., Zech, W., 2000. Availability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) to Earthworms in Urban Soils. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4335–4340. doi:10.1021/es001137s
- Kreader, C.A., 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1102–1106.
- Kreitinger, J.P., Quñones-Rivera, A., Neuhauser, E.F., Alexander, M., Hawthorne, S.B., 2007. Supercritical carbon dioxide extraction as a predictor of polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulation and toxicity by earthworms in manufactured-gas plant site soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1809–1817. doi:10.1897/06-608R.1
- Kroer, N., Barkay, T., Sørensen, S., Weber, D., 1998. Effect of root exudates and bacterial metabolic activity on conjugal gene transfer in the rhizosphere of a marsh plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25, 375–384. doi:10.1016/S0168-6496(98)00007-5
- Kronholm, J., Kalpala, J., Hartonen, K., Riekkola, M.-L., 2002. Pressurized hot water extraction coupled with supercritical water oxidation in remediation of sand and soil containing PAHs. *J. Supercrit. Fluids* 23, 123–134. doi:10.1016/S0896-8446(02)00008-6
- Krsek, M., Wellington, E.M.H., 1999. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *J. Microbiol. Methods* 39, 1–16. doi:10.1016/S0167-7012(99)00093-7
- KucEROVÁ, P., Wiesche, C. in der, Wolter, M., Macek, T., Zadrazil, F., Macková, M., 2001. The ability of different plant species to remove polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls from incubation media. *Biotechnol. Lett.* 23, 1355–1359. doi:10.1023/A:1010502023311
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J., 2004. Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 17, 6–15. doi:10.1094/MPMI.2004.17.1.6
- Kumar, M., Puri, A., 2012. A review of permissible limits of drinking water. *Indian J. Occup. Environ. Med.* 16, 40–44. doi:10.4103/0019-5278.99696

- Kummerová, M., Kmentová, E., 2004. Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plant seedling. *Chemosphere* 56, 387–393. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.01.007
- Kummerová, M., Kmentova, E., Koptikova, J. (Masarykova U., 2001. Effect of fluoranthene on growth and primary processes of photosynthesis in faba bean and sunflower. *Rostl. Vyroba - UZPI Czech Repub.*
- Kummerová, M., Krulová, J., Zezulka, Š., Tříška, J., 2006. Evaluation of fluoranthene phytotoxicity in pea plants by Hill reaction and chlorophyll fluorescence. *Chemosphere* 65, 489–496. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.01.052
- Kunihiro, M., Ozeki, Y., Nogi, Y., Hamamura, N., Kanaly, R.A., 2013. Benz[a]anthracene Biotransformation and Production of Ring Fission Products by *Sphingobium* sp. Strain KK22. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4410–4420. doi:10.1128/AEM.01129-13
- Kura-Hotta, M., Satoh, K., Katoh, S., 1987. Relationship between Photosynthesis and Chlorophyll Content during Leaf Senescence of Rice Seedlings. *Plant Cell Physiol.* 28, 1321–1329.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1216–1223.
- Laflamme, R.E., Hites, R.A., 1979. Tetra- and pentacyclic, naturally-occurring, aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 43, 1687–1691. doi:10.1016/0016-7037(79)90188-1
- Lafleur, A.L., Taghizadeh, K., Howard, J.B., Anacleto, J.F., Quilliam, M.A., 1996. Characterization of flame-generated C10 to C160 polycyclic aromatic hydrocarbons by atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry with liquid introduction via heated nebulizer interface. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 7, 276–286. doi:10.1016/1044-0305(95)00651-6
- LaMontagne, M.G., Michel Jr., F.C., Holden, P.A., Reddy, C.A., 2002. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *J. Microbiol. Methods* 49, 255–264. doi:10.1016/S0167-7012(01)00377-3
- Landahl, J.T., McCain, B.B., Myers, M.S., Rhodes, L.D., Brown, D.W., 1990. Consistent associations between hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) and polycyclic aromatic hydrocarbons in bottom sediment. *Environ. Health Perspect.* 89, 195.
- Lang, E., Nerud, F., Zadrazil, F., 1998. Production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* in soil and lignocellulose substrate as influenced by soil microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 167, 239–244. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb13234.x

- Laor, Y., Farmer, W.J., Aochi, Y., Strom, P.F., 1998. Phenanthrene binding and sorption to dissolved and to mineral-associated humic acid. *Water Res.* 32, 1923–1931. doi:10.1016/S0043-1354(97)00405-3
- Launen, L.A., Buggs, V.H., Eastep, M.E., Enriquez, R.C., Leonard, J.W., Blaylock, M.J., Huang, J.-W., Häggblom, M.M., 2002. Bioremediation of Polyaromatic Hydrocarbon-Contaminated Sediments in Aerated Bioslurry Reactors. *Bioremediation J.* 6, 125–141. doi:10.1080/10588330208951209
- Ledesma, E.B., Kalish, M.A., Nelson, P.F., Wornat, M.J., Mackie, J.C., 2000. Formation and fate of PAH during the pyrolysis and fuel-rich combustion of coal primary tar. *Fuel* 79, 1801–1814. doi:10.1016/S0016-2361(00)00044-2
- Leduc, R., Samson, R., Al-Bashir, B., Al-Hawari, J., Cseh, T., 1992. Biotic and Abiotic Disappearance of Four PAH Compounds from Flooded Soil under Various Redox Conditions. *Water Sci. Technol.* 26, 51–60.
- Lee, H., Jang, Y., Choi, Y.-S., Kim, M.-J., Lee, J., Lee, H., Hong, J.-H., Lee, Y.M., Kim, G.-H., Kim, J.-J., 2014. Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAHs. *J. Microbiol. Methods* 97, 56–62. doi:10.1016/j.mimet.2013.12.007
- Lee, S.-H., Lee, W.-S., Lee, C.-H., Kim, J.-G., 2008. Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. *J. Hazard. Mater.* 153, 892–898. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.09.041
- Lee, S.Y., Bollinger, J., Bezdicek, D., Ogram, A., 1996. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3787–3793.
- Lerda, D., 2011. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) factsheet - 4th Edition (Technical Report No. JRC 66955). Institute for Reference Materials and Measurements, Belgium.
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J.C., Scurlock, J.M.O., Huisman, W., 2000. *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass Bioenergy* 19, 209–227.
- Lewandowski, I., Kicherer, A., 1997. Combustion quality of biomass: practical relevance and experiments to modify the biomass quality of *Miscanthus x giganteus*. *Eur. J. Agron.* 6, 163–177. doi:10.1016/S1161-0301(96)02044-8
- Lewandowski, I., Kicherer, A., Vonier, P., 1995. CO₂-balance for the cultivation and combustion of *Miscanthus*. *Biomass Bioenergy* 8, 81–90. doi:10.1016/0961-9534(95)00008-U
- Lewandowski, I., Scurlock, J.M.O., Lindvall, E., Christou, M., 2003. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass Bioenergy* 25, 335–361. doi:10.1016/S0961-9534(03)00030-8
- Leys, N.M., Bastiaens, L., Verstraete, W., Springael, D., 2005. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 726–736.

- Leyval, C., Berthelin, J., 1993. Rhizodeposition and net release of soluble organic compounds by pine and beech seedlings inoculated with rhizobacteria and ectomycorrhizal fungi. *Biol. Fertil. Soils* 15, 259–267. doi:10.1007/BF00337210
- Li, C.-T., Lin, Y.-C., Lee, W.-J., Tsai, P.-J., 2003. Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons and their carcinogenic potencies from cooking sources to the urban atmosphere. *Environ. Health Perspect.* 111, 483–487.
- Li, C., 2010. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the subsurface sediment of mangrove wetland (thesis). City University of Hong Kong.
- Liebeg, E.W., Cutright, T.J., 1999. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 44, 55–64. doi:10.1016/S0964-8305(99)00060-8
- Lin, H., Tao, S., Zuo, Q., Coveney, R.M., 2007. Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by maize plants. *Environ. Pollut.* 148, 614–619. doi:10.1016/j.envpol.2006.11.026
- Lin, J.-E., Wang, H.Y., Hickey, R.F., 1991. Use of Coimmobilized Biological Systems to Degrade Toxic Organic Compounds. *ResearchGate* 38, 273–279. doi:10.1002/bit.260380309
- Linde-Laursen, I., 1993. Cytogenetic Analysis of *Miscanthus* “Giganteus”, an Interspecific Hybrid. *Hereditas* 119, 297–300. doi:10.1111/j.1601-5223.1993.00297.x
- Ling, W., Ren, L., Gao, Y., Zhu, X., Sun, B., 2009. Impact of low-molecular-weight organic acids on the availability of phenanthrene and pyrene in soil. *Soil Biol. Biochem.* 41, 2187–2195. doi:10.1016/j.soilbio.2009.08.003
- Ling, W., Zeng, Y., Gao, Y., Dang, H., Zhu, X., 2010. Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons in aging soils. *J. Soils Sediments* 10, 799–807. doi:10.1007/s11368-010-0187-5
- Liste, H.-H., Alexander, M., 2000. Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil. *Chemosphere* 40, 11–14. doi:10.1016/S0045-6535(99)00217-9
- Liu, H., Amy, G., 1993. Modeling partitioning and transport interactions between natural organic matter and polynuclear aromatic hydrocarbons in groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1553–1562. doi:10.1021/es00045a009
- Liu, R., Xiao, N., Wei, S., Zhao, L., An, J., 2014. Rhizosphere effects of PAH-contaminated soil phytoremediation using a special plant named Fire Phoenix. *Sci. Total Environ.* 473–474, 350–358. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.027
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R.B., Taghavi, S., Mezgeay, M., Lelie, D. van der, 2002. Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 583–606. doi:10.1080/0735-260291044377
- Lombard, N., Prestat, E., van Elsas, J.D., Simonet, P., 2011. Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78, 31–49. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01140.x

- Long, S.P., 1983. C4 photosynthesis at low temperatures. *Plant Cell Environ.* 6, 345–363. doi:10.1111/1365-3040.ep11612141
- López-Gutiérrez, J.C., Henry, S., Hallet, S., Martin-Laurent, F., Catroux, G., Philippot, L., 2004. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 57, 399–407. doi:10.1016/j.mimet.2004.02.009
- Löser, C., Seidel, H., Zehnsdorf, A., Stottmeister, U., 1998. Microbial degradation of hydrocarbons in soil during aerobic/anaerobic changes and under purely aerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 631–636. doi:10.1007/s002530051225
- Lu, A., Zhang, S., Qin, X., Wu, W., Liu, H., 2009. Aging effect on the mobility and bioavailability of copper in soil. *J. Environ. Sci.* 21, 173–178. doi:10.1016/S1001-0742(08)62247-0
- Luch, A., Greim, H., Buters, J.T.M., Mahadevan, B., Baird, W.M., Doehmer, J., Seidel, A., Glatt, H., 2002. The Role of Cytochrome P450 1B1 in Dibenzo[a,l]pyrene-induced Carcinogenesis. *Polycycl. Aromat. Compd.* 22, 781–789. doi:10.1080/10406630290103933
- Lueders, T., Wagner, B., Claus, P., Friedrich, M.W., 2004. Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environ. Microbiol.* 6, 60–72. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00535.x
- Luna, G.M., Dell’Anno, A., Danovaro, R., 2006. DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environ. Microbiol.* 8, 308–320. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00896.x
- Lutz, S., 2006. Evaluation du risque de transfert des hydrocarbures aromatiques polycycliques du sol vers le lait chez le ruminant laitier. Institut National Polytechnique de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy.
- Lynch, J.M., Whipps, J.M., 1991. Substrate flow in the rhizosphere, in: Keister, D.L., Cregan, P.B. (Eds.), *The Rhizosphere and Plant Growth*, Beltsville Symposia in Agricultural Research. Springer Netherlands, pp. 15–24. doi:10.1007/978-94-011-3336-4_2
- Ma, B., Chen, H., He, Y., Wang, H., Xu, J., 2010. Evaluation of toxicity risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in crops rhizosphere of contaminated field with sequential extraction. *J. Soils Sediments* 10, 955–963. doi:10.1007/s11368-010-0212-8
- Ma, L., Zhang, J., Han, L., Li, W., Xu, L., Hu, F., Li, H., 2012a. The effects of aging time on the fraction distribution and bioavailability of PAH. *Chemosphere* 86, 1072–1078. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.11.065
- Ma, L.L., Ma, C., Shi, Z.M., Li, W.M., Xu, L., Hu, F., Li, H.X., 2012b. Effects of fluoranthene on the growth, bioavailability and anti-oxidant system of *Eisenia fetida* during the ageing process. *Eur. J. Soil Biol.* 50, 21–27. doi:10.1016/j.ejsobi.2011.11.005

- Maarit Niemi, R., Heiskanen, I., Wallenius, K., Lindström, K., 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Methods* 45, 155–165. doi:10.1016/S0167-7012(01)00253-6
- Macleod, C.J.A., Semple, K.T., 2003. Sequential extraction of low concentrations of pyrene and formation of non-extractable residues in sterile and non-sterile soils. *Soil Biol. Biochem.* 35, 1443–1450. doi:10.1016/S0038-0717(03)00238-4
- MacLeod, C.J.A., Semple, K.T., 2000. Influence of Contact Time on Extractability and Degradation of Pyrene in Soils. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4952–4957. doi:10.1021/es000061x
- Maes, E., Schadeck, S., Brahy, V., 2006. Rapport analytique sur l'état de l'environnement wallon 2006-2007. PARTIE 3: Analyse de l'état des composantes de l'environnement. Chapitre 11 : Les sols et l'environnement terrestre (Rapport analytique). Ministère de la Région Wallone - Direction Générale des Ressources Naturelles et de l'Environnement, Wallonie.
- Magee, B.R., Lion, L.W., Lemley, A.T., 1991. Transport of dissolved organic macromolecules and their effect on the transport of phenanthrene in porous media. *Environ. Sci. Technol.* 25, 323–331. doi:10.1021/es00014a017
- Mahaffey, W.R., Gibson, D.T., Cerniglia, C.E., 1988. Bacterial oxidation of chemical carcinogens: formation of polycyclic aromatic acids from benz[a]anthracene. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2415–2423.
- Maigari, A.U., Maigari, M.U., 2015. Microbial metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. *Int. J. Sci. Eng. Res.* 6, 1449–1459.
- Maliszewska-Kordybach, B., Smreczak, B., 2000. Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-effect on plants. *Environ. Technol.* 21, 1099–1110.
- Mallakin, A., Babu, T.S., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., 2002. Sites of toxicity of specific photooxidation products of anthracene to higher plants: Inhibition of photosynthetic activity and electron transport in *Lemna gibba* L. G-3 (Duckweed). *Environ. Toxicol.* 17, 462–471. doi:10.1002/tox.10080
- Mancera-López, M.E., Esparza-García, F., Chávez-Gómez, B., Rodríguez-Vázquez, R., Saucedo-Castañeda, G., Barrera-Cortés, J., 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 61, 151–160. doi:10.1016/j.ibiod.2007.05.012
- Marcato-Romain, C.-E., Guiresse, M., Cecchi, M., Cotellet, S., Pinelli, E., 2009. New direct contact approach to evaluate soil genotoxicity using the *Vicia faba* micronucleus test. *Chemosphere* 77, 345–350. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.07.016
- Marchand, C., St-Arnaud, M., Hogland, W., Bell, T.H., Hijri, M., 2017. Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 116, 48–57.

- Marilley, L., Vogt, G., Blanc, M., Aragno, M., 1998. Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis of 16S rDNA. *Plant Soil* 198, 219–224. doi:10.1023/A:1004309008799
- Marín, F., Sánchez, J.L., Arauzo, J., Fuertes, R., Gonzalo, A., 2009. Semichemical pulping of *Miscanthus giganteus*. Effect of pulping conditions on some pulp and paper properties. *Bioresour. Technol.* 100, 3933–3940. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.011
- Marr, L.C., Kirchstetter, T.W., Harley, R.A., Miguel, A.H., Hering, S.V., Hammond, S.K., 1999. Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Motor Vehicle Fuels and Exhaust Emissions. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3091–3099. doi:10.1021/es981227l
- Martinez Chois, C., 2012. Réhabilitation des sols pollués par les éléments traces métalliques grâce aux bactéries du sol associées à la rhizosphère de *Miscanthus x giganteus*. Université de Lorraine, France.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G., Catroux, G., 2001. DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2354–2359. doi:10.1128/AEM.67.5.2354-2359.2001
- Martínez, A.T., 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.*, Recent Advances in Lignin Biodegradation 30, 425–444. doi:10.1016/S0141-0229(01)00521-X
- Mashreghi, M., 2006. Survival and activity of lux-marked phenanthrene-degrading *Pseudomonas stutzeri* P16 under different conditions. *Iran. J. Sci. Technol. Sci.* 30, 71–80.
- Mastral, A.M., Callén, M.S., 2000. A Review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Emissions from Energy Generation. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3051–3057. doi:10.1021/es001028d
- Materechera, S.A., Kirby, J.M., Alston, A.M., Dexter, A.R., 1994. Modification of soil aggregation by watering regime and roots growing through beds of large aggregates. *Plant Soil* 160, 57–66. doi:10.1007/BF00150346
- Matlaga, D.P., Davis, A.S., 2013. Minimizing invasive potential of *Miscanthus x giganteus* grown for bioenergy: identifying demographic thresholds for population growth and spread. *J. Appl. Ecol.* 50, 479–487.
- Matsuzawa, S., Nasser-Ali, L., Garrigues, P., 2001. Photolytic Behavior of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Diesel Particulate Matter Deposited on the Ground. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3139–3143. doi:10.1021/es001606q
- McCutcheon, S.C., Schnoor, J.L., 2004. *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*. John Wiley & Sons.
- McLachlan, M.S., 1999. Framework for the Interpretation of Measurements of SOC in Plants. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1799–1804. doi:10.1021/es980831t

- McNally, D.L., Mihelcic, J.R., Lueking, D.R., 1999. Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions. *Chemosphere, Degradation Processes in the Environment* 38, 1313–1321. doi:10.1016/S0045-6535(98)00532-3
- McNear Jr., D.H., 2013. The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. *Nat. Educ. Knowl.* 4, 1.
- Meckenstock, R.U., Safinowski, M., Griebler, C., 2004. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49, 27–36. doi:10.1016/j.femsec.2004.02.019
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Naidu, R., 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ. Int.* 37, 1362–1375. doi:10.1016/j.envint.2011.06.003
- Megharaj, M., Wittich, R.-M., Blasco, R., Pieper, D.H., Timmis, K.N., 1997. Superior survival and degradation of dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran in soil by soil-adapted *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 109–114. doi:10.1007/s002530051024
- Meharg, A.A., Killham, K., 1990. The effect of soil pH on rhizosphere carbon flow of *Lolium perenne*. *Plant Soil* 123, 1–7. doi:10.1007/BF00009920
- Menció, A., Mas-Pla, J., Otero, N., Regàs, O., Boy-Roura, M., Puig, R., Bach, J., Domènech, C., Zamorano, M., Brusi, D., Folch, A., 2016. Nitrate pollution of groundwater; all right..., but nothing else? *Sci. Total Environ.* 539, 241–251. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.08.151
- Merbach, W., Mirus, E., Knof, G., Remus, R., Ruppel, S., Russow, R., Gransee, A., Schulze, J., 1999. Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and their possible ecological importance+. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 162, 373–383. doi:10.1002/(SICI)1522-2624(199908)162:4<373::AID-JPLN373>3.0.CO;2-#
- Mihelcic, J.R., Luthy, R.G., 1988. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1182–1187.
- Milić, J., Avdalović, J., Šolević-Knudsen, T., Gojgić-Cvijović, G., Jednak, T., Vrvic, M.M., 2016. Initial microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 43–43.
- Mohan, S.V., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, R.A., Shimizu, Y., 2006. Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5, 347–374. doi:10.1007/s11157-006-0004-1
- Mojtahid, M., 2014. Continuité écologique des cours d'eau et services rendus par les écosystèmes, en relation avec les vulnérabilités significatives que connaît le bassin de la Loire et ses affluents (Rapport scientifique SEMHABEL, FEDER), Plan Loire Grandeur Nature. Université d'Angers.
- Mollea, C., Bosco, F., Ruggeri, B., 2005. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. *Chemosphere* 60, 636–643. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.01.034

- Moody, J.D., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E., 2005. Degradation of benz[a]anthracene by *Mycobacterium vanbaalenii* strain PYR-1. *Biodegradation* 16, 513–526. doi:10.1007/s10532-004-7217-1
- Moody, J.D., Freeman, J.P., Fu, P.P., Cerniglia, C.E., 2004. Degradation of Benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 340–345. doi:10.1128/AEM.70.1.340-345.2004
- Moore, F.P., Barac, T., Borremans, B., Oeyen, L., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., Campbell, C.D., Moore, E.R.B., 2006. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 539–556. doi:10.1016/j.syapm.2005.11.012
- Moorhead, D.L., Westerfield, M.M., Zak, J.C., 1998. Plants retard litter decay in a nutrient-limited soil: a case of exploitative competition? *Oecologia* 113, 530–536. doi:10.1007/s004420050406
- Moré, M.I., Herrick, J.B., Silva, M.C., Ghiorse, W.C., Madsen, E.L., 1994. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1572–1580.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol. Res.* 165, 363–375. doi:10.1016/j.micres.2009.08.001
- Muela, A., Pocino, M., Arana, I., Justo, J.I., Iriberry, J., Barcina, I., 1994. Effect of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4273–4278.
- Muratova, A.Y., Golubev, S., Wittenmayer, L., Dmitrieva, T., Bondarenkova, A., Hirche, F., Merbach, W., Turkovskaya, O., 2009a. Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene on root exudation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Environ. Exp. Bot.* 66, 514–521. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.03.001
- Muratova, A.Y., Kapitonova, V.V., Chernyshova, M.P., Turkovskaya, O.V., 2009b. Enzymatic Activity of Alfalfa in a Phenanthrene-contaminated Environment. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 34, 569–574.
- Murphy, B.W., 2014. Soil organic matter and soil function – Review of the literature and underlying data.
- Murphy, E.M., Zachara, J.M., Smith, S.C., 1990. Influence of mineral-bound humic substances on the sorption of hydrophobic organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1507–1516. doi:10.1021/es00080a009
- Muyzer, G., Waal, E.C. de, Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.

- Nam, K., Alexander, M., 1998. Role of Nanoporosity and Hydrophobicity in Sequestration and Bioavailability: Tests with Model Solids. *Environ. Sci. Technol.* 32, 71–74. doi:10.1021/es9705304
- Nam, K., Chung, N., Alexander, M., 1998. Relationship between Organic Matter Content of Soil and the Sequestration of Phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3785–3788. doi:10.1021/es980428m
- Nam, K., Kim, J.Y., 2002. Role of loosely bound humic substances and humin in the bioavailability of phenanthrene aged in soil. *Environ. Pollut.* 118, 427–433. doi:10.1016/S0269-7491(01)00296-2
- Nam, K., Kim, J.Y., Oh, D.I., 2003. Effect of soil aggregation on the biodegradation of phenanthrene aged in soil. *Environ. Pollut.* 121, 147–151. doi:10.1016/S0269-7491(02)00181-1
- Nardi, S., Sessi, E., Pizzeghello, D., Sturaro, A., Rella, R., Parvoli, G., 2002. Biological activity of soil organic matter mobilized by root exudates. *Chemosphere* 46, 1075–1081. doi:10.1016/S0045-6535(01)00160-6
- Ndira, V., 2006. Substances humiques du sol et du compost. Analyse élémentaire et groupements atomiques fictifs : vers une approche thermodynamique (phd).
- Nedunuri, K.V., Govindaraju, R.S., Banks, M.K., Schwab, A.P., Chen, Z., 2000. Evaluation of Phytoremediation for Field-Scale Degradation of Total Petroleum Hydrocarbons. *J. Environ. Eng.* 126, 483–490. doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(2000)126:6(483)
- Neukirchen, D., Himken, M., Lammel, J., Czypionka-Krause, U., Olf, H.-W., 1999. Spatial and temporal distribution of the root system and root nutrient content of an established *Miscanthus* crop. *Eur. J. Agron.* 11, 301–309. doi:10.1016/S1161-0301(99)00031-3
- Newman, L.A., Reynolds, C.M., 2004. Phytodegradation of organic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 225–230. doi:10.1016/j.copbio.2004.04.006
- NF EN ISO 11269-2, 2013. Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 2: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants.
- NF ISO 11268-1, 2012. Soil quality - Effects of pollutants on earthworms - Part 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*.
- NF ISO 11465, 1994. Soil quality - Determination of dry matter and water content on a mass basis - Gravimetric method.
- NF ISO 13877, 1999. Qualité du sol - Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques - Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance.
- NF T 90-327, 2004. Soil quality - Assessment of genotoxic effects on higher plants - Evaluation of the frequency of micronuclei in secondary roots of *Vicia faba*.
- NF X31-003, 1998. Qualité du sol - Descripteur du sol.

- Nguyen, C., 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* 23, 375–396. doi:10.1051/agro:2003011
- Nielsen, T., 1996. Traffic contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the center of a large city. *Atmos. Environ.* 30, 3481–3490. doi:10.1016/1352-2310(96)00096-9
- Nieman, J.K.C., Sims, R.C., Sims, J.L., Sorensen, D.L., McLean, J.E., Rice, J.A., 1999. [14C]Pyrene Bound Residue Evaluation Using MIBK Fractionation Method for Creosote-Contaminated Soil. *Environ. Sci. Technol.* 33, 776–781. doi:10.1021/es980609o
- Nijskens, P., 2001. Guide pratique de la culture de *Miscanthus*.
- Nikaido, H., 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 593–656.
- Nikaido, H., 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 516–523. doi:10.1016/S1369-5274(98)80083-0
- Nikaido, H., 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 178, 5853–5859.
- Ning, J., Liebich, J., Kästner, M., Zhou, J., Schäffer, A., Burauel, P., 2009. Different influences of DNA purity indices and quantity on PCR-based DGGE and functional gene microarray in soil microbial community study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 983–993. doi:10.1007/s00253-009-1912-0
- Northcott, G.L., Jones, K.C., 2001. Partitioning, Extractability, and Formation of Nonextractable PAH Residues in Soil. 1. Compound Differences in Aging and Sequestration. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1103–1110. doi:10.1021/es000071y
- Nsanganwimana, F., Pourrut, B., Mench, M., Douay, F., 2014. Suitability of *Miscanthus* species for managing inorganic and organic contaminated land and restoring ecosystem services. A review. *J. Environ. Manage.* 143, 123–134. doi:10.1016/j.jenvman.2014.04.027
- Nurmiaho-Lassila, E.-L., Timonen, S., Haahtela, K., Sen, R., 1997. Bacterial colonization patterns of intact *Pinus sylvestris* mycorrhizospheres in dry pine forest soil: an electron microscopy study. *Can. J. Microbiol.* 43, 1017–1035. doi:10.1139/m97-147
- Obayori, O.S., Salam, L.B., 2010. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Role of plasmids. *Sci. Res. Essays* 5, 4093–4106.
- Ogawa, H., Amagai, Y., Koike, I., Kaiser, K., Benner, R., 2001. Production of Refractory Dissolved Organic Matter by Bacteria. *Science* 292, 917–920. doi:10.1126/science.1057627
- Ogbonna, O.J., Ekpote, W.B., Onyekpe, P.I., Udenze, E.C.C., Ogbeihe, G.O., 2013. Antimicrobial agent production by fungi isolates from petroleum product contaminated soil. *Arch. Appl. Sci. Res.* 5, 1–6. doi:10.0975/aasr/2013/508
- Ogram, A., Sayler, G.S., Barkay, T., 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* 7, 57–66. doi:10.1016/0167-7012(87)90025-X

Ogunseitan, O.A., Delgado, I.L., Tsai, Y.L., Olson, B.H., 1991. Effect of 2-hydroxybenzoate on the maintenance of naphthalene-degrading pseudomonads in seeded and unseeded soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2873–2879.

Oguntimehin, I., Nakatani, N., Sakugawa, H., 2008. Phytotoxicities of fluoranthene and phenanthrene deposited on needle surfaces of the evergreen conifer, Japanese red pine (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.). *Environ. Pollut.* 154, 264–271. doi:10.1016/j.envpol.2007.10.039

Ohwaki, Y., Sugahara, K., 1997. Active extrusion of protons and exudation of carboxylic acids in response to iron deficiency by roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *ResearchGate* 189, 49–55. doi:10.1023/A:1004271108351

Olson, N.D., Morrow, J.B., 2012. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Res. Notes* 5, 668.

Olson, P.E., Castro, A., Joern, M., DuTeau, N.M., Pilon-Smits, E.A.H., Reardon, K.F., 2007. Comparison of plant families in a greenhouse phytoremediation study on an aged polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 36, 1461–1469. doi:10.2134/jeq2006.0371

O'Neill, N.R. (usda, Farr, D.F., 1996. *Miscanthus* blight, a new foliar disease of ornamental grasses and sugarcane incited by *Leptosphaeria* sp. and its anamorphic state *Stagonospora* sp. *Plant Dis. USA*.

Ophoff, H., Stork, A., Veerkamp, W., Führ, F., 1996. Volatilization and Mineralization of [3-14C]Fluoranthene After Soil Incorporation and Soil Surface Application. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 64, 97–109. doi:10.1080/03067319608028339

Ortega-Calvo, J.J., Marchenko, A.I., Vorobyov, A.V., Borovick, R.V., 2003. Chemotaxis in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from coal-tar- and oil-polluted rhizospheres. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 373–381. doi:10.1016/S0168-6496(03)00092-8

OSPAR Commission, 2001. Best Environmental Practice for the Reduction or Prevention of Emissions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) from Domestic Combustion Appliances. OSPAR Commission, Best Available Techniques (BAT) and Best Environmental Practice (BEP) Series.

Pagé, A.P., Yergeau, É., Greer, C.W., 2015. *Salix purpurea* Stimulates the Expression of Specific Bacterial Xenobiotic Degradation Genes in a Soil Contaminated with Hydrocarbons. *PLOS ONE* 10, e0132062. doi:10.1371/journal.pone.0132062

PAHs position paper, 2001. Ambient Air Pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH). Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

Pajor, R., Falconer, R., Hapca, S., Otten, W., 2010. Modelling and quantifying the effect of heterogeneity in soil physical conditions on fungal growth. *Biogeosciences* 7, 3731–3740. doi:10.5194/bg-7-3731-2010

- Pan, M.J., Rademan, S., Kunert, K., Hastings, J.W., 1997. Ultrastructural Studies on the Colonization of Banana Tissue and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4 by the Endophytic Bacterium *Burkholderia cepacia*. *J. Phytopathol.* 145, 479–486. doi:10.1111/j.1439-0434.1997.tb00354.x
- Pandey, G., Paul, D., Jain, R.K., 2005. Conceptualizing “suicidal genetically engineered microorganisms” for bioremediation applications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327, 637–639. doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.080
- Pandya, S., Iyer, P., Gaitonde, V., Parekh, T., Desai, A., 1999. Chemotaxis of *Rhizobium* SP.S2 Towards *Cajanus cajan* Root Exudate and Its Major Components. *Curr. Microbiol.* 38, 205–209. doi:10.1007/PL00006788
- Park, K.S., Sims, R.C., Dupont, R.R., Doucette, W.J., Matthews, J.E., 1990. Fate of PAH compounds in two soil types: Influence of volatilization, abiotic loss and biological activity. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 187–195. doi:10.1002/etc.5620090208
- Paull, R.E., Jones, R.L., 1975. Studies on the Secretion of Maize Root Cap Slime: II. Localization of Slime Production. *Plant Physiol.* 56, 307–312.
- Pavel, A.B., Vasile, C.I., 2012. PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics* 13, 9. doi:10.1186/1471-2105-13-9
- Pavel, P.-B., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., Diacu, E., Barbu, C.H., 2014. Aided phytostabilization using *Miscanthus sinensis* × *giganteus* on heavy metal-contaminated soils. *Sci. Total Environ.* 479–480, 125–131. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.01.097
- Pelmont, J., 1996. Bactéries et environnement adaptations physiologiques, Grenoble Sciences - Rencontres Scientifique. EDP Sciences, Grenoble.
- Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Xue, Y., Fu, X.-Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.-S., Yao, Q.-H., 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 927–955. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x
- Percuoco, G., Formisano, M., 1982. About the utilization of the gallic acid from telluric microflora in soils. *Ann. Della Fac. Sci. Agrar. Dell'Università Degli Studi Napoli Portici Italy.*
- Péter, S., Palme, G.E., Röhrborn, G., 1979. Mutagenicity of polycyclic hydrocarbons III. Monitoring genetic hazards of benz(a)anthracene. *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.* 27, 199–204.
- Petric, I., Philippot, L., Abbate, C., Bispo, A., Chesnot, T., Hallin, S., Laval, K., Lebeau, T., Lemanceau, P., Leyval, C., Lindström, K., Pandard, P., Romero, E., Sarr, A., Schlöter, M., Simonet, P., Smalla, K., Wilke, B.-M., Martin-Laurent, F., 2011. Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 “Soil quality — Method to directly extract DNA from soil samples.” *J. Microbiol. Methods* 84, 454–460. doi:10.1016/j.mimet.2011.01.016
- Piatt, J.J., Brusseau, M.L., 1998. Rate-Limited Sorption of Hydrophobic Organic Compounds by Soils with Well-Characterized Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1604–1608. doi:10.1021/es970461t

Pichtel, J., 2014. Waste Management Practices: Municipal, Hazardous, and Industrial, Second Edition. CRC Press.

Picot, A., Montandon, F., 2013. Écotoxicochimie des hydrocarbures. Lavoisier.

Ping, L., Luo, Y., Wu, L., Qian, W., Song, J., Christie, P., 2006. Phenanthrene adsorption by soils treated with humic substances under different pH and temperature conditions. Environ. Geochem. Health 28, 189–195. doi:10.1007/s10653-005-9030-0

Piper, K.R., von Bodman, S.B., Farrand, S.K., 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. Nature 362, 448–450.

Plavinet, J.P., Coquet, Y., 2013. La protection et la gestion durable des sols face au droit. Etude Gest. Sols 20, 39–62.

Poonthrigpun, S., Pattaragulwanit, K., Paengthai, S., Kriangkripipat, T., Juntongjin, K., Thaniyavarn, S., Petsom, A., Pinphanichakarn, P., 2006. Novel Intermediates of Acenaphthylene Degradation by *Rhizobium* sp. Strain CU-A1: Evidence for Naphthalene-1,8-Dicarboxylic Acid Metabolism. Appl. Environ. Microbiol. 72, 6034–6039. doi:10.1128/AEM.00897-06

Portella, G., Poater, J., Solà, M., 2005. Assessment of Clar's aromatic π -sextet rule by means of PDI, NICS and HOMA indicators of local aromaticity. J. Phys. Org. Chem. 18, 785–791. doi:10.1002/poc.938

Porteous, M.L.A., Armstrong, J.L., 1991. Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method. Curr. Microbiol. 22, 345–348. doi:10.1007/BF02092152

Potin, O., Rafin, C., Veignie, E., 2004a. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. Int. Biodeterior. Biodegrad. 54, 45–52. doi:10.1016/j.ibiod.2004.01.003

Potin, O., Veignie, E., Rafin, C., 2004b. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. FEMS Microbiol. Ecol. 51, 71–78.

Powlson, D.S., Gregory, P.J., Whalley, W.R., Quinton, J.N., Hopkins, D.W., Whitmore, A.P., Hirsch, P.R., Goulding, K.W.T., 2011. Soil management in relation to sustainable agriculture and ecosystem services. Food Policy 36, S72–S87.

Pradhan, S.P., Conrad, J.R., Paterek, J.R., Srivastava, V.J., 1998. Potential of Phytoremediation for Treatment of PAHs in Soil at MGP Sites. J. Soil Contam. 7, 467–480. doi:10.1080/10588339891334401

Prasifka, J.R., Bradshaw, J.D., Meagher, R.L., Nagoshi, R.N., Steffey, K.L., Gray, M.E., 2009. Development and Feeding of Fall Armyworm on *Miscanthus × giganteus* and Switchgrass. J. Econ. Entomol. 102, 2154–2159. doi:10.1603/029.102.0619

Prescott, L.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J., 2010. Microbiologie. De Boeck Supérieur.

- Priemé, A., Sitaula, J.I.B., Klemetsson, Å.K., Bakken, L.R., 1996. Extraction of methane-oxidizing bacteria from soil particles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21, 59–68.
- Pritchard, P.H., 1992. Use of inoculation in bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3, 232–243. doi:10.1016/0958-1669(92)90098-4
- Punnapayak, H., Prasongsuk, S., Messner, K., Danmek, K., Lotrakul, P., 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation by laccase from a tropical white rot fungus *Ganoderma lucidum*. *Afr. J. Biotechnol.* 8. doi:10.4314/ajb.v8i21.66070
- Pyter, R.J., Dohleman, F.G., Voigt, T.B., 2010. Effects of rhizome size, depth of planting and cold storage on *Miscanthus x giganteus* establishment in the Midwestern USA. *Biomass Bioenergy* 34, 1466–1470. doi:10.1016/j.biombioe.2010.04.014
- Qiu, X., Leland, T.W., Shah, S.I., Sorensen, D.L., Kendall, E.W., 1997. Field Study: Grass Remediation for Clay Soil Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, in: *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 186–199.
- Quinn, L.D., Allen, D.J., Stewart, J., 2010. Invasiveness potential of *Miscanthus sinensis*: implications for bioenergy production in the United States. *GCB Bioenergy* 2, 310–320.
- Quinn, L.D., Matlaga, D.P., Stewart, J.R., Davis, A.S., 2011. Empirical Evidence of Long-Distance Dispersal in *Miscanthus sinensis* and *Miscanthus × giganteus*. *Invasive Plant Sci. Manag.* 4, 142–150. doi:10.1614/IPSM-D-10-00067.1
- Quintero-Ramos, M., Espinoza-Victoria, D., Ferrera-Cerrato, R., Bethlenfalvay, G.J., 1993. Fitting plants to soil through mycorrhizal fungi: Mycorrhiza effects on plant growth and soil organic matter. *Biol. Fertil. Soils* 15, 103–106. doi:10.1007/BF00336426
- Raghu, S., Anderson, R.C., Daehler, C.C., Davis, A.S., Wiedenmann, R.N., Simberloff, D., Mack, R.N., 2006. Adding biofuels to the invasive species fire? *Sci.-N. Y. THEN Wash.-* 313, 1742.
- Ramadan, M.A., Hashem, A.M., Amin, M.A., Rfky, N.H., 2012. Immobilization and Surfactant Enhanced Anthracene Biodegradation in Soil. *J. Am. Sci.* 8.
- Ranjard, L., Richaume, A., 2001. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbiol.* 152, 707–716. doi:10.1016/S0923-2508(01)01251-7
- Raskin, I., Ensley, B.D., 2000. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. J. Wiley, New York.
- Rathbone, K., Fuchs, J., Anderson, K., Karthikeyan, R., Nurhidayat, N., 1998. Effects of PAHs on microbial activity and diversity in freshly contaminated and weathered soils, in: *Proceedings of the 1998 Conference on Hazardous Waste Research*. Citeseer, Utah, USA, pp. 383–402.
- Ravindra, K., Sokhi, R., Van Grieken, R., 2008. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmos. Environ.* 42, 2895–2921. doi:10.1016/j.atmosenv.2007.12.010

- Reddy, B.R., Sethunathan, N., 1983. Mineralization of Parathion in the Rice Rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 826–829.
- Reilley, K.A., Banks, M.K., Schwab, A.P., 1996. Dissipation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Rhizosphere. *J. Environ. Qual.* 25, 212. doi:10.2134/jeq1996.00472425002500020002x
- Rentz, J.A., Alvarez, P.J.J., Schnoor, J.L., 2008. Benzo[a]pyrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02. *Environ. Pollut.* 151, 669–677.
- Rentz, J.A., Alvarez, P.J.J., Schnoor, J.L., 2005. Benzo[a]pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: Implications for phytoremediation. *Environ. Pollut.* 136, 477–484. doi:10.1016/j.envpol.2004.12.034
- Revuelta, C.C., Santiago, E. de la F., Vázquez, J.A.R., 1999. Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Emissions from Coal-Fired Power Plants: The Influence of Operation Parameters. *Environ. Technol.* 20, 61–68. doi:10.1080/09593332008616793
- Reynaud, S., Deschaux, P., 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquat. Toxicol.* 77, 229–238. doi:10.1016/j.aquatox.2005.10.018
- Rezek, J., in der Wiesche, C., Mackova, M., Zadrazil, F., Macek, T., 2008. The effect of ryegrass (*Lolium perenne*) on decrease of PAH content in long term contaminated soil. *Chemosphere* 70, 1603–1608. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.08.003
- Richaume, A., Smit, E., Faurie, G., van Elsas, J.D., 1992. Influence of soil type on the transfer of plasmid RP4p from *Pseudomonas fluorescens* to introduced recipient and to indigenous bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 101, 281–291. doi:10.1111/j.1574-6968.1992.tb05785.x
- Richter, H., Howard, J.B., 2000. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their growth to soot—a review of chemical reaction pathways. *Prog. Energy Combust. Sci.* 26, 565–608. doi:10.1016/S0360-1285(00)00009-5
- Riding, M.J., Doick, K.J., Martin, F.L., Jones, K.C., Semple, K.T., 2013. Chemical measures of bioavailability/bioaccessibility of PAHs in soil: Fundamentals to application. *J. Hazard. Mater.* 261, 687–700. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.03.033
- Rifat Zubair, A., Nuzhat, A., 2016. Isolation of *Rhodococcus* sp. CMGCZ Capable to Degrade High Concentration of Fluoranthene. *Water. Air. Soil Pollut.* 227, 162. doi:10.1007/s11270-016-2857-4
- Rillig, M.C., Mardatin, N.F., Leifheit, E.F., Antunes, P.M., 2010. Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi increases soil water repellency and is sufficient to maintain water-stable soil aggregates. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1189–1191.
- Ripp, S., Nivens, D.E., Ahn, Y., Werner, C., Jarrell, J., Easter, J.P., Cox, C.D., Burlage, R.S., Saylor, G.S., 2000. Controlled field release of a bioluminescent genetically engineered microorganism for bioremediation process monitoring and control. *Environ. Sci. Technol.* 34, 846–853.

- Ritz, K., Young, I.M., 2004. Interactions between soil structure and fungi. *Mycologist* 18, 52–59.
- Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., Vogel, T.M., Simonet, P., 2003. Extraction of DNA from soil. *Eur. J. Soil Biol.* 39, 183–190. doi:10.1016/S1164-5563(03)00033-5
- Robert, M., 1996. Le sol : interface dans l'environnement, ressource pour le développement. Masson, Paris (France).
- Robinson, S.L., Novak, J.T., Widdowson, M.A., Crosswell, S.B., Fetterolf, G.J., 2003. Field and Laboratory Evaluation of the Impact of Tall Fescue on Polyaromatic Hydrocarbon Degradation in an Aged Creosote-Contaminated Surface Soil. *J. Environ. Eng.* 129, 232–240. doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(2003)129:3(232)
- Rocha, I., Pinto, E., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Silva, M.V. da, Oliveira, R.S., 2014. Influence of mixtures of acenaphthylene and benzo[a]anthracene on their degradation by *Pleurotus ostreatus* in sandy soil. *J. Soils Sediments* 14, 829–834. doi:10.1007/s11368-013-0804-1
- Rockne, K.J., Chee-Sanford, J.C., Sanford, R.A., Hedlund, B.P., Staley, J.T., Strand, S.E., 2000. Anaerobic Naphthalene Degradation by Microbial Pure Cultures under Nitrate-Reducing Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1595–1601. doi:10.1128/AEM.66.4.1595-1601.2000
- Rockne, K.J., Strand, S.E., 2001. Anaerobic biodegradation of naphthalene, phenanthrene, and biphenyl by a denitrifying enrichment culture. *Water Res.* 35, 291–299. doi:10.1016/S0043-1354(00)00246-3
- Ronen, Z., Vasiluk, L., Abeliovich, A., Nejdat, A., 2000. Activity and survival of tribromophenol-degrading bacteria in a contaminated desert soil. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1643–1650. doi:10.1016/S0038-0717(00)00080-8
- Roose-Amsaleg, C.L., Garnier-Sillam, E., Harry, M., 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Appl. Soil Ecol.* 18, 47–60. doi:10.1016/S0929-1393(01)00149-4
- Rosales, E., Pérez-Paz, A., Vázquez, X., Pazos, M., Sanromán, M.A., 2012. Isolation of novel benzo[a]anthracene-degrading microorganisms and continuous bioremediation in an expanded-bed bioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35, 851–855. doi:10.1007/s00449-011-0669-x
- Roudier, P., 2005. Techniques de réhabilitation des sites et sols pollués - Fiches de synthèse.
- Rousk, J., Brookes, P.C., Baath, E., 2009. Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1589–1596. doi:10.1128/AEM.02775-08
- Rovira, A.D., 1959. Root excretions in relation to the rhizosphere effect: IV. Influence of plant species, age of plant, light, temperature, and calcium nutrition on exudation. *Plant Soil* 11, 53–64.

- Rubin, B.E.R., Sanders, J.G., Hampton-Marcell, J., Owens, S.M., Gilbert, J.A., Moreau, C.S., 2014. DNA extraction protocols cause differences in 16S rRNA amplicon sequencing efficiency but not in community profile composition or structure. *MicrobiologyOpen* 3, 910–921. doi:10.1002/mbo3.216
- Ruellan, A., 2010. Le sol et ses fonctions, in: *Des Sols et Des Hommes : Un Lien Menacé*, Hors Collection. IRD Éditions, Montpellier, pp. 53–68.
- Ruellan, A., Blanchart, E., Brauman, A., Grimaldi, M., Grünberger, O., Barbiero, L., Chaplot, V., Monga, O., Bernoux, M., 2008. les sols, des milieux vivants très fragiles.
- Rugh, C., Thomas, J.C., Russell, D.K., Leinaur, B., Carreira, L., 2004. Ecological influences on PAH-phytoremediation. *Int. J. Phytoremediation* 6, 187.
- Rutkowska, A., Pikula, D., 2013. Effect of Crop Rotation and Nitrogen Fertilization on the Quality and Quantity of Soil Organic Matter, in: *Soil Processes and Current Trends in Quality Assessment*. Maria C. Hernandez Soriano.
- Ryan, J.A., Bell, R.M., Davidson, J.M., O'Connor, G.A., 1988. Plant uptake of non-ionic organic chemicals from soils. *Chemosphere* 17, 2299–2323. doi:10.1016/0045-6535(88)90142-7
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J., Dowling, D.N., 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* 278, 1–9. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x
- Sagova-Mareckova, M., Cermak, L., Novotna, J., Plhackova, K., Forstova, J., Kopecky, J., 2008. Innovative Methods for Soil DNA Purification Tested in Soils with Widely Differing Characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2902–2907. doi:10.1128/AEM.02161-07
- Saiz-Jimenez, C., 1996. The chemical structure of humic substances: Recent advances, in: *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Alessandro Piccolo, p. 675.
- Salzer, P., Corbière, H., Boller, T., 1999. Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta* 208, 319–325. doi:10.1007/s004250050565
- Sánchez-Guerra, M., Pelallo-Martínez, N., Díaz-Barriga, F., Rothenberg, S.J., Hernández-Cadena, L., Faugeron, S., Oropeza-Hernández, L.F., Guaderrama-Díaz, M., Quintanilla-Vega, B., 2012. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA damage in Mexican children. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 742, 66–71. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.12.006
- Santos, E. dos, Rosa, C. da, Passos, C. dos, Sanzo, A.V.L., Burkert, J.F.M., Kalil, S.J., Burkert, C. a. V., 2008. Pre-screening of filamentous fungi isolated from a contaminated site in Southern Brazil for bioaugmentation purposes. *Afr. J. Biotechnol.* 7.
- Saponaro, S., Bonomo, L., Petruzzelli, G., Romele, L., Barbafieri, M., 2002. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Slurry Phase Bioremediation of a Manufacturing Gas Plant (MGP) Site Aged Soil. *Water. Air. Soil Pollut.* 135, 219–236. doi:10.1023/A:1014716502484

- Sayara, T., Borràs, E., Caminal, G., Sarrà, M., Sánchez, A., 2011. Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: Influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 859–865. doi:10.1016/j.ibiod.2011.05.006
- Sayler, G.S., Ripp, S., 2000. Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 286–289.
- Schneegurt, M.A., Dore, S.Y., Kulpa Jr, C.F., 2003. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. *Curr. Issues Mol. Biol.* 5, 1–8.
- Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W., Warshawsky, D., 1996. Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 13–19.
- Schnitzer, M., Khan, S.U., 1975. *Soil Organic Matter*. Elsevier.
- Schuler, L., Jouanneau, Y., Chadhain, S.M.N., Meyer, C., Pouli, M., Zylstra, G.J., Hols, P., Agathos, S.N., 2009. Characterization of a ring-hydroxylating dioxygenase from phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. strain LH128 able to oxidize benz[a]anthracene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 465–475. doi:10.1007/s00253-009-1858-2
- Schwab, A.P., Al-Assi, A.A., Banks, M.K., 1998. Adsorption of Naphthalene onto Plant Roots. *J. Environ. Qual.* 27, 220. doi:10.2134/jeq1998.00472425002700010031x
- Schwab, A.P., Banks, M.K., 1994. Biologically Mediated Dissipation of Polyaromatic Hydrocarbons in the Root Zone, in: *Bioremediation through Rhizosphere Technology*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 132–141.
- Scott, M.J., Jones, M.N., 2000. The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, Detergents in Biomembrane Studies 1508, 235–251. doi:10.1016/S0304-4157(00)00013-7
- Selenska, S., Klingmüller, W., 1991. DNA recovery and direct detection of Tn5 sequences from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 13, 21–24. doi:10.1111/j.1472-765X.1991.tb00559.x
- Senn, T.L., Kingman, A.R., 1973. A review of humus and humic acids. *Res. Ser.*
- Seo, J.-S., Keum, Y.-S., Li, Q.X., 2009. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 6, 278–309. doi:10.3390/ijerph6010278
- Shahsavari, E., Adetutu, E.M., Taha, M., Ball, A.S., 2015. Rhizoremediation of phenanthrene and pyrene contaminated soil using wheat. *J. Environ. Manage.* 155, 171–176. doi:10.1016/j.jenvman.2015.03.027
- Shao, D., Li, J., Li, J., Tang, R., Liu, L., Shi, J., Huang, Q., Yang, H., 2015. Inhibition of Gallic Acid on the Growth and Biofilm Formation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. *J. Food Sci.* 80, M1299-1305. doi:10.1111/1750-3841.12902
- Shaw, L.J., Burns, R.G., 2003. Biodegradation of Organic Pollutants in the Rhizosphere, in: *Microbiology*, B.-A. in A. (Ed.), . Academic Press, pp. 1–60.

- Shaw, L.J., Morris, P., Hooker, J.E., 2006. Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environ. Microbiol.* 8, 1867–1880. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01141.x
- Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y., 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* 95, 1–6. doi:10.1111/j.1349-7006.2004.tb03162.x
- Shrestha, B., Anderson, T.A., Acosta-Martinez, V., Payton, P., Cañas-Carrell, J.E., 2015. The influence of multiwalled carbon nanotubes on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) bioavailability and toxicity to soil microbial communities in alfalfa rhizosphere. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 116, 143–149. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.03.005
- Siddens, L.K., Bunde, K.L., Harper Jr., T.A., McQuistan, T.J., Löhr, C.V., Bramer, L.M., Waters, K.M., Tilton, S.C., Krueger, S.K., Williams, D.E., Baird, W.M., 2015. Cytochrome P450 1b1 in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-induced skin carcinogenesis: Tumorigenicity of individual PAHs and coal-tar extract, DNA adduction and expression of select genes in the Cyp1b1 knockout mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 287, 149–160. doi:10.1016/j.taap.2015.05.019
- Silva, I.S., Grossman, M., Durrant, L.R., 2009a. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 224–229. doi:10.1016/j.ibiod.2008.09.008
- Silva, I.S., Menezes, C.R. de, Franciscon, E., Santos, E. da C. dos, Durrant, L.R., 2010. Degradation of lignosulfonic and tannic acids by ligninolytic soil fungi cultivated under microaerobic conditions. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53, 693–699. doi:10.1590/S1516-89132010000300026
- Silva, I.S., Santos, E. da C. dos, Menezes, C.R. de, Faria, A.F. de, Franciscon, E., Grossman, M., Durrant, L.R., 2009b. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresour. Technol.* 100, 4669–4675. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.079
- Sims, R.C., Overcash, M.R., 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems, in: Gunther, F.A. (Ed.), *Residue Reviews*, Residue Reviews. Springer New York, pp. 1–68. doi:10.1007/978-1-4612-5569-7_1
- Singh, B., Gilkes, R., 1991. Phosphorus sorption in relation to soil properties for the major soil types of South-Western Australia. *Soil Res.* 29, 603–618.
- Singh, J.S., Abhilash, P.C., Singh, H.B., Singh, R.P., Singh, D.P., 2011. Genetically engineered bacteria: An emerging tool for environmental remediation and future research perspectives. *Gene* 480, 1–9. doi:10.1016/j.gene.2011.03.001
- Singh, S.N., 2011. *Microbial Degradation of Xenobiotics*. Springer Science & Business Media.

- Skupinska, K., Misiewicz, I., Kasprzycka-Guttman, T., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. *Acta Pol. Pharm.* 61, 233–240.
- Smalla, K., Cresswell, N., Mendonca-Hagler, L. c., Wolters, A., Elsas, J.D. van, 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 78–85. doi:10.1111/j.1365-2672.1993.tb02999.x
- Smit, E., Elsas, J.D. van, Veen, J.A. van, Vos, W.M. de, 1991. Detection of Plasmid Transfer from *Pseudomonas fluorescens* to Indigenous Bacteria in Soil by Using Bacteriophage ϕ R2f for Donor Counterselection. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3482–3488.
- Smith, C.J., Osborn, A.M., 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67, 6–20.
- Smith, M.J., Flowers, T.H., Duncan, H.J., Alder, J., 2006. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environ. Pollut.* 141, 519–525. doi:10.1016/j.envpol.2005.08.061
- Soeder, C.J., Papaderos, A., Kleespies, M., Kneifel, H., Haegel, F.-H., Webb, L., 1996. Influence of phytogenic surfactants (quillaya saponin and soya lecithin) on bio-elimination of phenanthrene and fluoranthene by three bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 654–659. doi:10.1007/BF00172499
- Song, X., Xu, Y., Li, G., Zhang, Y., Huang, T., Hu, Z., 2011. Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2122–2128. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.07.013
- Stach, J.E., Bathe, S., Clapp, J.P., Burns, R.G., 2001. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 139–151.
- Stancu, M.M., Grifoll, M., 2011. Multidrug resistance in hydrocarbon-tolerant Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 57, 1–18. doi:10.2323/jgam.57.1
- Steffan, R.J., Goksøyr, J., Bej, A.K., Atlas, R.M., 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2908–2915.
- Stevenson, F.J., 1982. Extraction, fraction and general chemical composition of soil organic matter., in: *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. John Wiley & Sons, p. 496.
- Stewart, J.R., Toma, Y., Fernández, F.G., Nishiwaki, A., Yamada, T., Bollero, G., 2009. The ecology and agronomy of *Miscanthus sinensis*, a species important to bioenergy crop development, in its native range in Japan: a review. *GCB Bioenergy* 1, 126–153. doi:10.1111/j.1757-1707.2009.01010.x
- Strandberg, G.W., Abraham, T.J., Frazier, G.C., 1986. Phenanthrene degradation by *Beijerinckia* sp. B8/36. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 142–145.

- Su, Y.-H., Zhu, Y.-G., 2008. Uptake of selected PAHs from contaminated soils by rice seedlings (*Oryza sativa*) and influence of rhizosphere on PAH distribution. *Environ. Pollut.* 155, 359–365. doi:10.1016/j.envpol.2007.11.008
- Subramaniam, K., Stepp, C., Pignatello, J. j., Smets, B., Grasso, D., 2004. Enhancement of Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Desorption by Complexing Agents in Weathered Soil. *Environ. Eng. Sci.* 21, 515–523. doi:10.1089/1092875041358485
- Sun, G.-D., Xu, Y., Jin, J.-H., Zhong, Z.-P., Liu, Y., Luo, M., Liu, Z.-P., 2012. Pilot scale ex-situ bioremediation of heavily PAHs-contaminated soil by indigenous microorganisms and bioaugmentation by a PAHs-degrading and bioemulsifier-producing strain. *J. Hazard. Mater.* 233–234, 72–78. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.06.060
- Sun, R., Belcher, R.W., Liang, J., Wang, L., Thater, B., Crowley, D.E., Wei, G., 2015. Effects of cowpea (*Vigna unguiculata*) root mucilage on microbial community response and capacity for phenanthrene remediation. *J. Environ. Sci.* 33, 45–59. doi:10.1016/j.jes.2014.11.013
- Susarla, S., Medina, V.F., McCutcheon, S.C., 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.* 18, 647–658. doi:10.1016/S0925-8574(02)00026-5
- Sverdrup, L.E., Krogh, P.H., Nielsen, T., Kjaer, C., Stenersen, J., 2003. Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), ryegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*). *Chemosphere* 53, 993–1003. doi:10.1016/S0045-6535(03)00584-8
- Szewczyk, R., Długoński, J., 2009. Pentachlorophenol and spent engine oil degradation by *Mucor ramosissimus*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 123–129. doi:10.1016/j.ibiod.2008.08.001
- Tanase, A.-M., Mereuta, I., Chiciudean, I., Ionescu, R., Milea, L., Cornea, C.P., Vassu, T., Stoica, I., 2015. Comparison of Total DNA Extraction Methods for Microbial Community Form Polluted Soil. *Agric. Agric. Sci. Procedia, Conference Agriculture for Life, Life for Agriculture* 6, 616–622. doi:10.1016/j.aaspro.2015.08.102
- Tang, Y.J., Qi, L., Krieger-Brockett, B., 2005. Evaluating factors that influence microbial phenanthrene biodegradation rates by regression with categorical variables. *Chemosphere* 59, 729–741. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.10.037
- Tao, X.-Q., Lu, G., Dang, Z., Yi, X.-Y., 2007. A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils. *Process Biochem.* 42, 401–408. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2006.09.018
- Tao, Y., Zhang, S., Zhu, Y., Christie, P., 2009. Uptake and Acropetal Translocation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Wheat (*Triticum aestivum* L.) Grown in Field-Contaminated Soil. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3556–3560. doi:10.1021/es803368y
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, H.D., Inc, M.& E., 2003. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. McGraw-Hill Education.

- Tebbe, C.C., Vahjen, W., 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2657–2665.
- Técher, D., 2011. Réhabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus X giganteus*. Université Paul Verlaine de Metz, France.
- Técher, D., D’Innocenzo, M., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennasroune, A., Martinez-Chois, C., Falla, J., 2012a. Assessment of *Miscanthus x giganteus* secondary root metabolites for the biostimulation of PAH-utilizing soil bacteria. *Appl. Soil Ecol.* 62, 142–146. doi:10.1016/j.apsoil.2012.06.009
- Técher, D., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennasroune, A., Formanek, P., Martinez-Chois, C., D’Innocenzo, M., Muanda, F., Dicko, A., Rejšek, K., Falla, J., 2011. Contribution of *Miscanthus x giganteus* root exudates to the biostimulation of PAH degradation: An in vitro study. *Sci. Total Environ.* 409, 4489–4495. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.06.049
- Técher, D., Martinez-Chois, C., D’Innocenzo, M., Laval-Gilly, P., Bennasroune, A., Foucaud, L., Falla, J., 2010. Novel perspectives to purify genomic DNA from high humic acid content and contaminated soils. *Sep. Purif. Technol.* 75, 81–86. doi:10.1016/j.seppur.2010.07.014
- Técher, D., Martinez-Chois, C., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennasroune, A., D’Innocenzo, M., Falla, J., 2012b. Assessment of *Miscanthus x giganteus* for rhizoremediation of long term PAH contaminated soils. *Appl. Soil Ecol.* 62, 42–49. doi:10.1016/j.apsoil.2012.07.009
- Tejeda-Agredano, M.C., Gallego, S., Vila, J., Grifoll, M., Ortega-Calvo, J.J., Cantos, M., 2013. Influence of the sunflower rhizosphere on the biodegradation of PAHs in soil. *Soil Biol. Biochem.* 57, 830–840. doi:10.1016/j.soilbio.2012.08.008
- Teng, Y., Luo, Y., Sun, M., Liu, Z., Li, Z., Christie, P., 2010. Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresour. Technol.* 101, 3437–3443. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.088
- Terrat, S., Christen, R., Dequiedt, S., Lelièvre, M., Nowak, V., Regnier, T., Bachar, D., Plassart, P., Wincker, P., Jolivet, C., Bispo, A., Lemanceau, P., Maron, P.-A., Mougél, C., Ranjard, L., 2012. Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microb. Biotechnol.* 5, 135–141. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00307.x
- Thinggaard, K., 1997. Study of the role of *Fusarium* in the field establishment problem of *Miscanthus*. *Acta Agric. Scand. Sect. B — Soil Plant Sci.* 47, 238–241. doi:10.1080/09064719709362466
- Thion, C., 2012. Influence des Interactions bactéries-champignons sur la dissipation des HAP dans la rhizosphère. Université de Lorraine, Nancy.

- Thomas, F., Cébron, A., 2016. Short-Term Rhizosphere Effect on Available Carbon Sources, Phenanthrene Degradation, and Active Microbiome in an Aged-Contaminated Industrial Soil. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00092
- Torsvik, V., Sørheim, R., Goksøyr, J., 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities—A review. *J. Ind. Microbiol.* 17, 170–178. doi:10.1007/BF01574690
- Totsche, K.U., Danzer, J., Kögel-Knabner, I., 1997. Dissolved Organic Matter-Enhanced Retention of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil Miscible Displacement Experiments. *J. Environ. Qual.* 26, 1090. doi:10.2134/jeq1997.00472425002600040021x
- Tran, Q.N.M., Mimoto, H., Nakasaki, K., 2015. Inoculation of lactic acid bacterium accelerates organic matter degradation during composting. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 104, 377–383. doi:10.1016/j.ibiod.2015.07.007
- Troisi, G., Borjesson, L., Bexton, S., Robinson, I., 2007. Biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-associated hemolytic anemia in oiled wildlife. *Environ. Res.* 105, 324–329. doi:10.1016/j.envres.2007.06.007
- Truu, J., Truu, M., Espenberg, M., Nõlvak, H., Juhanson, J., 2015. Phytoremediation and plant-assisted bioremediation in soil and treatment wetlands: a review. *Open Biotechnol J* 9.
- Tsukiboshi, T., Takahashi, K., Uegaki, R., Sugawara, K., 2008. Black choke disease of warm season grasses caused by *Ephelis japonica* in Japan and its epiphytic features. *Jpn. Agric. Res. Q. JARQ* 42, 173–179.
- Tuháčková, J., Cajthaml, T., Novák, K., Novotný, Č., Mertelík, J., Šašek, V., 2001. Hydrocarbon deposition and soil microflora as affected by highway traffic. *Environ. Pollut.* 113, 255–262. doi:10.1016/S0269-7491(00)00193-7
- Ueno, A., Ito, Y., Yumoto, I., Okuyama, H., 2007. Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1739–1745. doi:10.1007/s11274-007-9423-6
- Uhlik, O., Musilova, L., Ridl, J., Hroudova, M., Vlcek, C., Koubek, J., Holeckova, M., Mackova, M., Macek, T., 2013. Plant secondary metabolite-induced shifts in bacterial community structure and degradative ability in contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9245–9256. doi:10.1007/s00253-012-4627-6
- van der Salm, C., Kros, J., de Vries, W., 2016. Evaluation of different approaches to describe the sorption and desorption of phosphorus in soils on experimental data. *Sci. Total Environ.* 571, 292–306. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.07.004
- Van Egeraat, A.W.S.M., 1975. Exudation of ninhydrin-positive compounds by pea-seedling roots: A study of the sites of exudation and of the composition of the exudate. *Plant Soil* 42, 37–47. doi:10.1007/BF02186972

- van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Starodub, M.E., 1988. Bacterial conjugation between pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiol. Lett.* 53, 299–306. doi:10.1111/j.1574-6968.1988.tb02676.x-i1
- van Hees, P.A.W., Jones, D.L., Finlay, R., Godbold, D.L., Lundström, U.S., 2005. The carbon we do not see—the impact of low molecular weight compounds on carbon dynamics and respiration in forest soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1–13. doi:10.1016/j.soilbio.2004.06.010
- Van-Camp, L., Bujarrabal, B., Gentile, A.R., Jones, R.J.A., Montanarella, L., Olazabal, C., Selvaradjou, S.K., 2004. Reports of the Technical Working Groups Established under the Thematic Strategy for Soil Protection (No. EUR 21319 EN/3). Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Vandendriessche, V., 2007. Etude des facteurs de rendement d'une espèce dédiée aux bioénergies : découverte des déterminants agronomiques de *Miscanthus x giganteus*. Etude des essais de Grignon et Lusignan (Mémoire de fin d'études). Institut supérieur d'agriculture de Lille, France.
- Veen, J.A. van, Overbeek, L.S. van, Elsas, J.D. van, 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 121–135.
- Velkov, V.V., 2001. Stress-induced evolution and the biosafety of genetically modified microorganisms released into the environment. *J. Biosci.* 26, 667. doi:10.1007/BF02704764
- Venturi, P., Huisman, W., Molenaar, J., 1998. Mechanization and costs of primary production chains for *Miscanthus x giganteus* in The Netherlands. *J. Agric. Eng. Res.* 69, 209–215.
- Verdin, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Newsam, R., Robinson, G., Durand, R., 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environ. Pollut.* 133, 283–291. doi:10.1016/j.envpol.2004.05.040
- Verdin, A., Sahraoui, A.L.-H., Durand, R., 2004. Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 53, 65–70. doi:10.1016/j.ibiod.2003.12.001
- Vergnoux, A., Malleret, L., Asia, L., Doumenq, P., Theraulaz, F., 2011. Impact of forest fires on PAH level and distribution in soils. *Environ. Res., Fire Effects on Soil Properties: Forest Fires and Prescribed Fires* 111, 193–198. doi:10.1016/j.envres.2010.01.008
- Vermeer, J., McCully, M.E., 1982. The rhizosphere in Zea: new insight into its structure and development. *Planta* 156, 45–61. doi:10.1007/BF00393442
- Verrhiest, G.J., Clément, B., Volat, B., Montuelle, B., Perrodin, Y., 2002. Interactions between a polycyclic aromatic hydrocarbon mixture and the microbial communities in a natural freshwater sediment. *Chemosphere* 46, 187–196. doi:10.1016/S0045-6535(01)00064-9
- Vespermann, A., Kai, M., Piechulla, B., 2007. Rhizobacterial Volatiles Affect the Growth of Fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5639–5641. doi:10.1128/AEM.01078-07

- Villaverde, J.J., Ligeró, P., Vega, A. de, 2010. *Miscanthus x giganteus* as a Source Of Biobased Products Through Organosolv Fractionation: A Mini Review. *ResearchGate* 4, 102–110. doi:10.2174/1874331501004010102
- Vogel, T.M., 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 311–316. doi:10.1016/S0958-1669(96)80036-X
- Volkering, F., Breure, A.M., Andel, J.G. van, Rulkens, W.H., 1995. Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1699–1705.
- Volkering, F., Breure, A.M., Rulkens, W.H., 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8, 401–417.
- Wagenaar, B.M., Van den Heuvel, E.J.M.T., 1997. Biomass Quality for Power Production Co-combustion of *Miscanthus* in a pulverised coal combustor: Experiments in a droptube furnace. *Biomass Bioenergy* 12, 185–197. doi:10.1016/S0961-9534(97)00009-3
- Wakeham, S.G., Schaffner, C., Giger, W., 1980. Poly cyclic aromatic hydrocarbons in Recent lake sediments—II. Compounds derived from biogenic precursors during early diagenesis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 44, 415–429. doi:10.1016/0016-7037(80)90041-1
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., Vivanco, J.M., 2003. Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiol.* 132, 44–51. doi:10.1104/pp.102.019661
- Walter, U., Beyer, M., Klein, J., Rehm, H.-J., 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 671–676. doi:10.1007/BF00167921
- Walton, B.T., Hoylman, A.M., Perez, M.M., Anderson, T.A., Johnson, T.R., Guthrie, E.A., Christman, R.F., 1994. Rhizosphere Microbial Communities as a Plant Defense Against Toxic Substances in Soils, in: *Bioremediation through Rhizosphere Technology*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 82–92.
- Wammer, K.H., Peters, C.A., 2005. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation Rates: A Structure-Based Study. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2571–2578. doi:10.1021/es048939y
- Wanat, N., Austruy, A., Joussein, E., Soubrand, M., Hitmi, A., Gauthier-Moussard, C., Lenain, J.-F., Vernay, P., Munch, J.C., Pichon, M., 2013. Potentials of *Miscanthus x giganteus* grown on highly contaminated Technosols. *J. Geochem. Explor.* 126–127, 78–84. doi:10.1016/j.gexplo.2013.01.001
- Wang, D., Portis, A.R., Moose, S.P., Long, S.P., 2008. Cool C4 Photosynthesis: Pyruvate Pi Dikinase Expression and Activity Corresponds to the Exceptional Cold Tolerance of Carbon Assimilation in *Miscanthus x giganteus*. *Plant Physiol.* 148, 557–567. doi:10.1104/pp.108.120709
- Ward, M.H., DeKok, T.M., Levallois, P., Brender, J., Gulis, G., Nolan, B.T., VanDerslice, J., 2005. Workgroup report: Drinking-water nitrate and health-recent findings and research needs. *Environ. Health Perspect.* 1607–1614.

- Watkins, J.W., Sorensen, D.L., Sims, R.C., 1994. Volatilization and mineralization of naphthalene in soil-grass microcosms.
- Watts, A.W., Ballester, T.P., Gardner, K.H., 2006. Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in salt marsh plants *Spartina alterniflora* grown in contaminated sediments. *Chemosphere* 62, 1253–1260. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.07.006
- Weiner, J.M., Lauck, T.S., Lovley, D.R., 1998. Enhanced anaerobic benzene degradation with the addition of sulfate. *Bioremediation J.* 2, 159–173. doi:10.1080/10889869809380374
- Weissenfels, W.D., Beyer, M., Klein, J., Rehm, H.J., 1991. Microbial metabolism of fluoranthene: isolation and identification of ring fission products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 528–535. doi:10.1007/BF00180583
- Weissenfels, W.D., Klewer, H.-J., Langhoff, J., 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 689–696. doi:10.1007/BF00183251
- Wenzel, W.W., 2009. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil* 321, 385–408. doi:10.1007/s11104-008-9686-1
- Werker, E., Kislev, M., 1978. Mucilage on the Root Surface and Root Hairs of Sorghum: Heterogeneity in Structure, Manner of Production and Site of Accumulation. *Ann. Bot.* 42, 809–816.
- Wertz, J.-L., 2010. La lignine. ValBiom - Gembloux Agro-Bio Tech.
- Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., Vangronsveld, J., 2009. Phytoremediation: plant–endophyte partnerships take the challenge. *Curr. Opin. Biotechnol., Food biotechnology / Plant biotechnology* 20, 248–254. doi:10.1016/j.copbio.2009.02.012
- Wheatley, R.E., 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 357–364. doi:10.1023/A:1020592802234
- White, R.E., 2006. Principles and Practice of Soil Science: The Soil as a Natural Resource, Blackwell Publishing. ed. John Wiley & Sons.
- Wick, A.F., Haus, N.W., Sukkariyah, B.F., Haering, K.C., Daniels, W.L., 2011. Remediation of PAH-Contaminated Soils and Sediments: A Literature Review.
- Wild, E., Dent, J., Thomas, G.O., Jones, K.C., 2005. Direct Observation of Organic Contaminant Uptake, Storage, and Metabolism within Plant Roots. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3695–3702. doi:10.1021/es048136a
- Wild, S.R., Jones, K.C., 1992a. Organic chemicals entering agricultural soils in sewage sludges: screening for their potential to transfer to crop plants and livestock. *Sci. Total Environ.* 119, 85–119. doi:10.1016/0048-9697(92)90258-T

- Wild, S.R., Jones, K.C., 1992b. Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Uptake by Carrots Grown in Sludge-Amended Soil. *J. Environ. Qual.* 21. doi:10.2134/jeq1992.00472425002100020010x
- Wilson, S.C., Jones, K.C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environ. Pollut.* 81, 229–249. doi:10.1016/0269-7491(93)90206-4
- Wolski, E.A., Murialdo, S.E., Gonzalez, J.F., 2005. Effect of pH and inoculum size on pentachlorophenol degradation by *Pseudomonas* sp. *Water SA* 32, 93–98. doi:10.4314/wsa.v32i1.5228
- Wolters, A., Kromer, T., Linnemann, V., Ophoff, H., Stork, A., Vereecken, H., 2002. Volatilization of (14C) fluoranthene and (14C) diflufenican after soil surface application under field-like conditions: Measurement and comparison with different model approaches. *Agron.-Sci. Prod. Veg. Environ.* 22, 337–350.
- Wood, A.W., Chang, R.L., Levin, W., Lehr, R.E., Schaefer-Ridder, M., Karle, J.M., Jerina, D.M., Conney, A.H., 1977a. Mutagenicity and cytotoxicity of benz[a]anthracene diol epoxides and tetrahydro-epoxides: Exceptional activity of the bay region 1,2-epoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 2746–2750.
- Wood, A.W., Levin, W., Chang, R.L., Lehr, R.E., Schaefer-Ridder, M., Karle, J.M., Jerina, D.M., Conney, A.H., 1977b. Tumorigenicity of five dihydrodiols of benz(a)anthracene on mouse skin: exceptional activity of benz(a)anthracene 3,4-dihydrodiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 3176–3179.
- Wood, A.W., Levin, W., Lu, A.Y.H., Ryan, D., West, S.B., Lehr, R.E., Schaefer-Ridder, M., Jerina, D.M., Conney, A.H., 1976. Mutagenicity of metabolically activated benzo[a]anthracene 3,4-dihydrodiol: Evidence for bay region activation of carcinogenic polycyclic hydrocarbons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 680–686. doi:10.1016/S0006-291X(76)80093-9
- Wrenn, B.A., Venosa, A.D., 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42, 252–258.
- Wu, Y.-R., He, T.-T., Lun, J.-S., Maskaoui, K., Huang, T.-W., Hu, Z., 2009. Removal of Benzo[a]pyrene by a fungus *Aspergillus* sp. BAP14. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1395–1401. doi:10.1007/s11274-009-0026-2
- Wu, Y.-R., Luo, Z.-H., Vrijmoed, L.L.P., 2010. Biodegradation of anthracene and benz[a]anthracene by two *Fusarium solani* strains isolated from mangrove sediments. *Bioresour. Technol.* 101, 9666–9672. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.049
- Xia, H.P., 2004. Ecological rehabilitation and phytoremediation with four grasses in oil shale mined land. *Chemosphere* 54, 345–353. doi:10.1016/S0045-6535(03)00763-X

XP CEN ISO/TS 21268-1, 2009. Soil quality - Leaching procedures for subsequent chemical and ecotoxicological testing of soil and soil materials - Part 1: Batch test using a liquid to solid ratio of 2l/kg dry matter.

Yang, H.-H., Lee, W.-J., Chen, S.-J., Lai, S.-O., 1998. PAH emission from various industrial stacks. *J. Hazard. Mater.* 60, 159–174. doi:10.1016/S0304-3894(98)00089-2

Yang, Y., Ratté, D., Smets, B.F., Pignatello, J.J., Grasso, D., 2001. Mobilization of soil organic matter by complexing agents and implications for polycyclic aromatic hydrocarbon desorption. *Chemosphere* 43, 1013–1021. doi:10.1016/S0045-6535(00)00498-7

Ye, D., Siddiqi, M.A., Maccubbin, A.E., Kumar, S., Sikka, H.C., 1996. Degradation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ. Sci. Technol.* 30, 136–142. doi:10.1021/es9501878

Yi, H., Crowley, D.E., 2007. Biostimulation of PAH degradation with plants containing high concentrations of linoleic acid. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4382–4388.

Ying, G.-G., 2006. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environ. Int.* 32, 417–431. doi:10.1016/j.envint.2005.07.004

Yrjälä, K., Mancano, G., Fortelius, C., Åkerman, M.-L., Sipilä, T.P., 2010. The incidence of *Burkholderia* in epiphytic and endophytic bacterial cenoses in hybrid aspen grown on sandy peat. *ResearchGate* 15, 81–96.

Yu, K.S.H., Wong, A.H.Y., Yau, K.W.Y., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 1071–1077. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.06.006

Yu, S.H., Ke, L., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environ. Int.*, Recent Advances in Bioremediation 31, 149–154. doi:10.1016/j.envint.2004.09.008

Yuan, S.Y., Wei, S.H., Chang, B.V., 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere* 41, 1463–1468. doi:10.1016/S0045-6535(99)00522-6

Zgurskaya, H.I., Nikaido, H., 2000. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol. Microbiol.* 37, 219–225. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01926.x

Zhang, L., Xu, C., Chen, Z., Li, X., Li, P., 2010. Photodegradation of pyrene on soil surfaces under UV light irradiation. *J. Hazard. Mater.* 173, 168–172. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.08.059

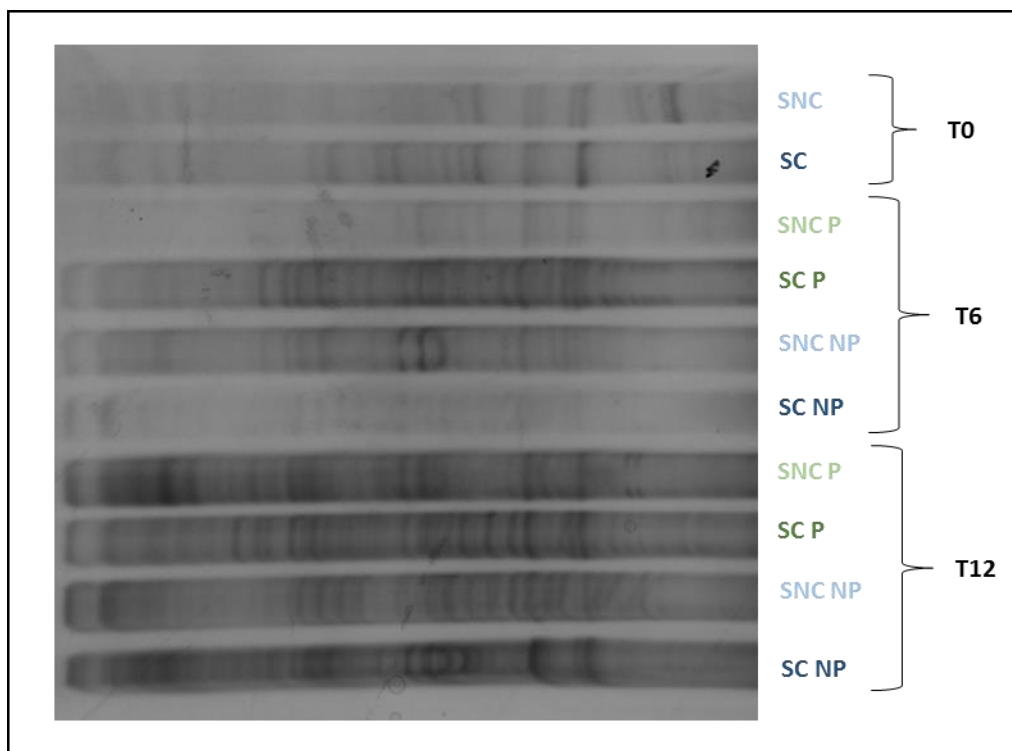
Zhang, X., Young, L.Y., 1997. Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4759–4764.

- Zhang, X.-X., Cheng, S.-P., Zhu, C.-J., Sun, S.-L., 2006. Microbial PAH-Degradation in Soil: Degradation Pathways and Contributing Factors. *Pedosphere* 16, 555–565. doi:10.1016/S1002-0160(06)60088-X
- Zhang, Y., Maier, W.J., Miller, R.M., 1997. Effect of Rhamnolipids on the Dissolution, Bioavailability, and Biodegradation of Phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2211–2217. doi:10.1021/es960687g
- Zhang, Y., Miller, R.M., 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3276–3282.
- Zheng, X.Y., Sinclair, J.B. (Dept of P.P., 1996. Chemotactic response of *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 to soybean root and seed exudates. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* U. K.
- Zheng, Z., Obbard, J.P., 2002. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Removal from Soil by Surfactant Solubilization and Oxidation. *J. Environ. Qual.* 31, 1842–1847. doi:10.2134/jeq2002.1842
- Zhou, H., Wu, C., Onwudili, J.A., Meng, A., Zhang, Y., Williams, P.T., 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) formation from the pyrolysis of different municipal solid waste fractions. *Waste Manag.* 36, 136–146. doi:10.1016/j.wasman.2014.09.014
- Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316–322.
- Zhou, L., Li, H., Zhang, Y., Han, S., Xu, H., 2016. *Sphingomonas* from petroleum-contaminated soils in Shenfu, China and their PAHs degradation abilities. *Braz. J. Microbiol.* 47, 271–278. doi:10.1016/j.bjm.2016.01.001
- Zhou, X., 2010. Experimental study of some parameters affecting polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) dissipation in the rhizosphere of mycorrhizal plants. Université Henri Poincaré, Nancy 1, France.
- Zhu, J., Zhao, Z., Lu, Y., 2006. Evaluation of genotoxicity of combined soil pollution by cadmium and phenanthrene on earthworm. *J. Environ. Sci.* 18, 1210–1215. doi:10.1016/S1001-0742(06)60064-8

ANNEXES

6. ANNEXES

Annexe 1. Gel TTGE réalisé à partir des réplicats 2 des échantillons d'ADN provenant de l'expérience de phyto/rhizoremédiation



Annexe 2. Composition du milieu de culture Super Optimal Broth (SOC)

Pour 1 L de milieu :

Bacto-tryptone : 20 g (2 %)

Extrait de levure : 5 g (0,5 %)

Chlorure de sodium : 0,58 g (10 mM)

Chlorure de potassium : 0,19 g (2,5 mM)

Chlorure de magnésium : 0,95 g (10 mM)

Sulfate de magnésium : 2,46 g (10 mM)

Glucose : 3,60 g (20 mM)

Eau distillée : jusqu'à 1 L

Annexe 3. Préparation des boîtes LB/Ampicilline/IPTG/X-Gal

Composition du milieu LB, pour 1 L :

Bacto-tryptone : 10 g (1 %)

Extrait de levure : 5 g (0,5 %)

Chlorure de sodium : 5 g (0,5 %)

Agar si milieu solide : 15 g (1,5 %)

Eau distillée : jusqu'à 1 L

L'ampicilline a été ajoutée dans le milieu LB à une concentration de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ après autoclavage.

Le milieu LB contenant l'ampicilline est coulé dans les boîtes de pétri puis après solidification, $100 \mu\text{L}$ d'une solution d'IPTG à 100 mg.mL^{-1} y sont étalés suivi de $20 \mu\text{L}$ d'une solution de X-Gal à 50 mg.mL^{-1} .

Annexe 4. Composition du milieu Bushnell-Haas

Le milieu a été préparé à partir de 3,27 g de poudre contenant déjà tous les éléments nutritifs (Difco) dans un litre d'eau distillée.

Cela représente pour 1 L de milieu :

Sulfate de magnésium : 0,2 g (0,02 %)

Chlorure de calcium : 0,02 g (0,002 %)

Phosphate de monopotassium : 1 g (0,1 %)

Phosphate de diammonium : 1 g (0,1 %)

Nitrate de potassium : 1 g (0,1 %)

Chlorure de fer : 0,05 g (0,005 %)

Annexe 5. Composition du milieu de Hoagland

Pour 1 L de milieu :

Nitrate de potassium : 10 mL (5 mM)

Nitrate de calcium tétrahydraté : 10 mL (5 mM)

Sulfate de magnésium heptahydraté : 10 mL (5 mM)

Phosphate de monopotassium : 10 mL (1 mM)

Tartrate de fer : 10 mL (9 μM)

RESUME

Les activités industrielles sont à l'origine d'un grand nombre de sites et sols pollués en France. Parmi les polluants retrouvés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), notamment ceux de haut poids moléculaire, posent un réel problème environnemental et de santé publique en raison de leur toxicité et de leur persistance dans les sols. Les techniques biologiques de remédiation qui stimulent la dégradation microbienne des HAP en utilisant des plantes (phyto/rhizoremédiation), des nutriments (biostimulation), ou encore des microorganismes (bioaugmentation), apparaissent comme des stratégies intéressantes car elles sont plus respectueuses de l'environnement et moins onéreuses que les méthodes physico-chimiques. Dans ce contexte, la capacité de la plante *Miscanthus x giganteus* (MxG) à améliorer la dissipation du benzo(a)anthracène (BaA), un HAP de haut poids moléculaire peu étudié en remédiation, a été évaluée par une approche pluridisciplinaire en réalisant deux types d'expérimentations à partir d'un sol artificiellement contaminé. La première a consisté à analyser l'influence rhizosphérique de la plante (phyto/rhizoremédiation) au cours d'une période de 12 mois. Les résultats ont montré que la présence de MxG conduisait en fin d'exposition à une réduction 3 fois plus importante de la teneur en BaA dans le sol grâce à une augmentation de la biodisponibilité du contaminant et à un effet positif sur les communautés microbiennes *via* une modification de leur diversité et une augmentation de leur densité de gènes ARNr 16S et PAH-RHD_α GP. Afin d'améliorer la compréhension de ce phénomène, une deuxième expérimentation a été mise en place sur une durée de 105 jours dans le but d'étudier spécifiquement l'influence de certaines molécules exsudées au niveau du système racinaire de la plante (biostimulation) et de microorganismes spécifiques, associés à sa rhizosphère, ayant la capacité de dégrader le BaA (bioaugmentation). Ces essais ont témoigné de la complexité des mécanismes rhizosphériques et de la nécessité d'approfondir ce type d'analyses afin d'améliorer la compréhension des processus de biodégradation dans la rhizosphère de la plante. L'ensemble de ces résultats a alors montré que MxG était une candidate idéale pour la phyto/rhizoremédiation de sols contaminés par des HAP de haut poids moléculaires mais que des études supplémentaires étaient encore nécessaires pour comprendre les processus intervenant dans sa rhizosphère.

Mots clés : phyto/rhizoremédiation, bioaugmentation, biostimulation, *Miscanthus x giganteus*, benzo(a)anthracène, sol, écologie microbienne

ABSTRACT

Industrial activities result of a large number of contaminated sites and soils in France. Among the pollutants found, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and especially those of high molecular weight, are a real environmental and public health problem because of their toxicity and persistence in soils. Biological remediation techniques which stimulate microbial degradation of PAHs using plants (phyto/rhizoremediation), nutrients (biostimulation), or microorganisms (bioaugmentation), appear as interesting strategies because they are more environmental friendly and less expensive than physico-chemical methods. In this context, the ability of the plant *Miscanthus x giganteus* (MxG) to improve benzo(a)anthracene (BaA) dissipation, a high molecular weight PAH few studied in remediation, was assessed with a multidisciplinary approach through two types of experimentations using an artificially contaminated soil. The first one was to analyze the rhizospheric influence of the plant (phyto/rhizoremediation) over a period of 12 months. Results showed that the presence of MxG led to a 3-fold reduction in BaA concentration in soil at the end of exposure thanks to an increase in pollutant bioavailability, and a positive effect on microbial communities due to a modification of their diversity and an increase in their 16S rRNA and PAH-RHD_α GP genes density. In order to improve the understanding of this phenomenon, a second experiment was carried out for 105 days to study specifically the influence of certain molecules exuded in the plant's root system (biostimulation), and specific microorganisms associated with its rhizosphere having the capacity to degrade BaA (bioaugmentation). These tests demonstrated the complexity of rhizospheric mechanisms, and the necessity to explore this type of analysis to improve the understanding of biodegradation processes in plant rhizosphere. All these results showed that MxG was an ideal candidate for phyto/rhizoremediation of soils contaminated with high molecular weight PAH, but that further studies were still needed to understand processes involved in its rhizosphere.

Keywords: phyto/rhizoremediation, bioaugmentation, biostimulation, *Miscanthus x giganteus*, benzo(a)anthracene, soil, microbial ecology