



**HAL**  
open science

# Dynamique des HAP et des composés organiques issus de leur transformation dans les compartiments du sol et de la rhizosphère

Johanne Cennerazzo

► **To cite this version:**

Johanne Cennerazzo. Dynamique des HAP et des composés organiques issus de leur transformation dans les compartiments du sol et de la rhizosphère. Ecologie, Environnement. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0042 . tel-01684207

**HAL Id: tel-01684207**

**<https://theses.hal.science/tel-01684207v1>**

Submitted on 15 Jan 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

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

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



Université de Lorraine  
École doctorale Ressources Produits Environnement  
Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux  
UMR 7360 CNRS – Université de Lorraine

## Thèse

Présentée en vue de l'obtention du titre de  
Docteur de l'Université de Lorraine en Géosciences

### **Dynamique des HAP et des composés organiques issus de leur transformation dans les compartiments du sol et de la rhizosphère**

par **Johanne CENNERAZZO**

**Soutenance publique le 10 avril 2017**

#### **Composition du jury :**

<b>Cornelia RUMPEL</b> <i>DR INRA, iEES Paris, AgroParisTech</i>	Rapporteuse
<b>Enrique BARRIUSO</b> , <i>DR INRA, ECOSYS, INRA-AgroParisTech</i>	Rapporteur
<b>Geneviève CHIAPUSIO</b> <i>MCF, Chrono-environnement, UFC, CARRTEL, Université Savoie-Mont Blanc</i>	Examinatrice
<b>Laurent REMUSAT</b> , <i>CR CNRS, MNHM, Paris</i>	Examineur
<b>Alexis de JUNET</b> <i>MCF, LIEC, Université de Lorraine</i>	Co-directeur de thèse
<b>Corinne LEYVAL</b> <i>DR CNRS, LIEC, Université de Lorraine</i>	Directrice de thèse

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux  
UMR 7360, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506



# REMERCIEMENTS

*Parce que ce travail n'est pas le fruit d'une seule personne ...*

*Je tiens tout d'abord à remercier et à exprimer ma reconnaissance à Corinne Leyval et Alexis de Junet pour leur aide, leurs conseils, leur écoute, leur confiance, et surtout leur PATIENCE tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir guidé, et de m'avoir permis d'aller au bout, ce fut très agréable de travailler avec vous.*

*Merci à Fabien Thomas, directeur du LIEC et Christian Mustin, directeur adjoint, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire.*

*J'exprime toute ma gratitude à Cornelia Rumpel, Enrique Barriuso, Geneviève Chiapusio et Laurent Remusat d'avoir accepté d'être membres de mon jury.*

*Un grand merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer tout au long de cette thèse, Jean-Nicolas Audinot et Patrick Grysan du LIST (Luxembourg), merci pour votre disponibilité, vos conseils et toute l'aide fournie pour la partie NanoSIMS. Je tiens également à remercier Nicolas Angeli et Christian Hossan de la plateforme PTEF de l'INRA Champenoux pour leur accueil, les nombreux échanges et pour les analyses IRMS. Un grand merci également à Gwendal Kervern pour les analyses RMN qui fut laborieuses, merci pour ta disponibilité et ta persévérance. Merci à Catherine Lorgeaux et Pierre Faure pour vos conseils et à Coralie Biache pour les analyses GCMS, merci pour votre aide. Merci également à Rémi Baldo pour son accueil au sein de la station expérimentale du GISFI. Merci à Renaud Gley et Angelina Razafitianamaharavo pour les analyses minéralogiques.*

*J'ai eu la chance de travailler avec une très belle équipe, merci donc à tous mes collègues, se fut un réel plaisir de travailler avec vous tous Laurence, Hervé, Géraldine, David (« ça y est j'arrête de débarquer dans ton bureau toutes les 5 minutes »), Sylvie (merci de m'avoir fait ressentir autant d'émotions devant un Podzol !), Thierry (tes grimaces vont me manquer), Aurélie, Anne, Caroline, Damien. Certains sont devenues bien plus que des collègues je les remercie pour tous les moments inoubliables je pense à ma « gang » : mon Quentinou, (mon*

BG, heueueueu just for u !) merci pour ton écoute, ta présence, ton aide, tu es un indispensable ! Mélo un énorme merci pour ta bonne humeur quotidienne, ta générosité, tes encouragements, tes coups de boosts. Dimi (mon Tic ou mon Tac je ne sais déjà plus ^^) mon super collègue de bureau avec qui j'ai adoré partager et comme tes blagues me manquent ! Merci pour ta bonne humeur, ton humour, on se voit tantôt ! Marine un grand merci pour ta spontanéité, d'être toujours à l'écoute, pour les conversations sans fin qu'on a eu toutes les deux. Merci à Romain, au p'tit roro (petit lapin !), Céline (ma fournisseuse officielle de vernis), Nini (le petit dernier !), Florian, Aurélie, Fadi (président !) merci pour tes superbes pâtisseries libanaises, Andrea (i am so sorry to speak with you only after to have drunk a couple of beers ;)), Coralie merci pour ta bonne humeur, ta disponibilité et ton écoute, François, Robin & Charlotte. Un grand merci à Cécile et Christine pour toutes les attentions que vous m'avez porté au cours de ces 3 ans, il y en a eu tellement, merci pour tout ! Merci à mes collègues de bureau, Asfaw et Patrick, j'ai eu la chance d'être si bien entourée (3 garçons pour moi toute seule ☺). Et merci à Clotilde nouvelle arrivée, merci pour tes découvertes suédoises, ta bonne humeur, et ton naturel c'était très sympa de partager ces derniers mois avec toi ... Merci également à mes deux stagiaires Jean et Narda avec qui j'ai eu un réel plaisir à travailler. Merci aussi à Louis (pour les nombreuses découvertes musicales) Marina, Guillaume and Co. Merci aussi aux doctorants que j'ai rencontré hors LIEC, Joan (Jo², on se voit tantôt) ! Ryad, Frédéric, Hermine & Co.  
En espérant avoir oublié personne ... sinon mille excuses !

Merci à mes proches, mes amis qui ont participé de près ou de loin à cette aventure... Mélanie et Amina : mes bests, mes jmiils, mes sommets, mes khtys, merci à vous Caly, Doud, Fanny, Fabounet, Jojo, GG, Julie, Déo, Marion & Vincent, Aurore & Fréd, Evelyne, Michelle, Corine... Et aussi aux belles rencontres que j'ai pu faire ces 3 dernières années je pense à vous Maïthé et Anne-Marie merci pour votre grande générosité, et votre partage, Miguel (the Columbian traveler) thanks a lot for the good moments and good vibes, mon Momo merci pour tes encouragements continuel et surtout de croire en moi ... (♪ «I am unfulfilled without your communion » ♪), merci à la gang « montréalaise » avec qui j'ai passé des moments mémorables lors de mon passage à l'été 2015.

Et pour finir, un immense merci à ma famille : maman merci de me donner la force de toujours persévérer, pour tes soutiens sans faille, je

*ne pourrais jamais te dire à quel point je suis reconnaissante et chanceuse de t'avoir merci ma moumoune, et j'espère te rendre fière quoi qu'il arrive ... Et vous Perrine, Sarah, Julie, mes sœurs adorées, ma force au quotidien, je vous en fais baver ... vous êtes toujours là donc MERCI tout simplement de faire partie de ma vie. Merci à toi Pierre d'être un formidable beau-père pleins d'attentions, de conseils et toujours là pour nous épauler. Merci à ma grand-mère adorée d'être toujours là, pour son écoute, ses conseils, sa bienveillance, et d'arriver à nous faire sourire même dans les moments les moins joyeux ... MERCI !*

*Merci à tous pour cette aventure inoubliable, pleine de rencontres, de surprises et surtout d'émotions.*

*« Tout obstacle renforce la détermination.  
Celui qui s'est fixé un but n'en change pas. » L De Vinci*



<b>TABLES DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>15</b>
<b>CHAPITRE I. ETAT DE L'ART.....</b>	<b>19</b>
<b>1. LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP).....</b>	<b>21</b>
1.1. PRESENTATION ET ORIGINES DES HAP .....	21
1.2. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES HAP .....	22
1.3. POLLUANTS ASSOCIES AUX HAP DANS UN SOL DE FRICHE INDUSTRIELLE .....	24
1.3.1. LES COMPOSES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES OXYGENES ET AZOTES .....	24
1.3.2. LES AUTRES COMPOSES ORGANIQUES.....	25
<b>2. DEVENIR DES HAP DANS LES SOLS .....</b>	<b>26</b>
2.1. VOLATILISATION, LESSIVAGE ET PHOTODEGRADATION .....	27
2.2. BIODEGRADATION ET BIOTRANSFORMATION DES HAP.....	28
2.2.1. VOIES METABOLIQUES DE DEGRADATION DES HAP PAR LES MICROORGANISMES.....	28
2.2.2. VOIES DE DEGRADATION DU PHE PAR LES BACTERIES ET LES CHAMPIGNONS.....	30
2.2.3. PRODUITS DE DEGRADATION ET DE TRANSFORMATION DES HAP.....	32
2.3. INTERACTIONS DES HAP AVEC LES CONSTITUANTS DU SOL.....	33
2.3.1. ROLE DE LA MATIERE ORGANIQUE DANS LA SORPTION DES HAP .....	34
2.3.2. REACTIVITE DES MINERAUX ET ADSORPTION DES HAP .....	37
2.3.3. INFLUENCE DES ASSOCIATIONS ORGANO-MINERALES SUR LA DYNAMIQUE DES HAP .....	39
2.3.4. BIODISPONIBILITE DES HAP ET VIEILLISSEMENT DE LA POLLUTION. ....	45
2.3.5. FORMATION D'UNE FRACTION NON EXTRACTIBLE DE HAP DANS LES SOLS.....	47
2.4. DEVENIR DES HAP DANS LA RHIZOSPHERE.....	48
2.4.1. LA RHIZOSPHERE : UNE INTERFACE DYNAMIQUE DU SOL .....	48
2.4.2. EFFET DE LA RHIZOSPHERE SUR LA DISSIPATION DES HAP.....	49
2.4.3. TRANSFERT DES HAP DANS LA PLANTE.....	50
2.5. GESTION DES SOLS CONTAMINES .....	51
<b>3. TECHNIQUES DE CARACTERISATION DES COMPOSES ORGANIQUES.....</b>	<b>52</b>
3.1. EXTRACTION DES MATIERES ORGANIQUES .....	52
3.1.1. METHODES CHIMIQUES : MO EXTRACTIBLES .....	52
3.1.2. METHODES PHYSIQUES : FRACTIONNEMENT DE LA MO.....	53
3.2. MARQUAGE ISOTOPIQUE DES COMPOSES ORGANIQUES .....	54
3.3. METHODES ANALYTIQUES : PYROLYSE ET THERMODESORPTION.....	54
3.4. SPECTROSCOPIE A RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE.....	56
<b>4. LA SPECTROMETRIE DE MASSE A IONS SECONDAIRES .....</b>	<b>58</b>
4.1. PRINCIPE GENERAL DE LA SIMS.....	58
4.2. EXPERIMENTATION ISOTOPIQUE COUPLEE A LA NANOSIMS.....	60
<b>5. OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>63</b>

<b>CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>69</b>
<b>1. PRESENTATION DES SOLS ETUDIES.....</b>	<b>71</b>
1.1 SOL DE FRICHE INDUSTRIELLE .....	71
1.2 SOL FORESTIER .....	72
<b>2. LES DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX .....</b>	<b>74</b>
<b>2.1. MESOCOSMES PLANTES POUR LE SUIVI D'UN HAP MARQUE AU <sup>13</sup>C .....</b>	<b>74</b>
2.1.1. MATERIEL BIOLOGIQUE .....	74
2.1.2. CONTAMINATION ARTIFICIELLE DU SOL FORESTIER AU <sup>13</sup> C-PHE .....	75
2.1.3. MONTAGE DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL .....	75
2.1.4. PLAN EXPERIMENTAL .....	76
2.1.5. METHODE D'ECHANTILLONNAGE.....	77
<b>2.2. MESOCOSMES DE SOL INDUSTRIEL HISTORIQUEMENT CONTAMINE AVEC APPORT OU NON D'UNE CONTAMINATION FRAICHE .....</b>	<b>78</b>
2.2.1. MONTAGE DES DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX.....	78
2.2.2. STABILISATION DE LA CONTAMINATION.....	78
<b>3. TRAITEMENTS DES ECHANTILLONS ET ANALYSES.....</b>	<b>79</b>
<b>3.1. EXTRACTION ACCELEREE PAR SOLVANT (ASE) .....</b>	<b>79</b>
3.1.1. EXTRACTION DES HAP AU DICHLOROMETHANE (DCM).....	80
3.1.2. EXTRACTION DES COMPOSES ORGANIQUES A L'EAU ULTRA-PURE.....	81
<b>3.2. FRACTIONNEMENT DENSIMETRIQUE.....</b>	<b>82</b>
3.2.1. CHOIX DES COUPURES .....	83
3.2.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	85
3.2.3. EXPRESSION DES RESULTATS.....	87
<b>3.3. ANALYSES MINERALOGIQUES PAR DIFFRACTION DES RAYONS X (DRX).....</b>	<b>88</b>
<b>3.4. MESURE DES SURFACES SPECIFIQUES PAR LA METHODE BET.....</b>	<b>89</b>
<b>3.5. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES .....</b>	<b>89</b>
3.5.1. NOMBRE LE PLUS PROBABLE (NPP) DE MICROORGANISMES .....	89
3.5.2. EXTRACTION D'ADN.....	89
<b>3.6. ANALYSES ORGANIQUES .....</b>	<b>90</b>
3.6.1. ANALYSES ELEMENTAIRES PAR CHN.....	90
3.6.2. ANALYSES ISOTOPIQUES $\Delta^{13}\text{C}$ PAR IRMS.....	91
3.6.3. ANALYSES DES HAP PAR UHPLC .....	93
3.6.4. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU CARBONE 13 ( <sup>13</sup> C-RMN).....	93
3.6.5. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A UN DETECTEUR A IONISATION DE FLAMME (GC-FID) 94	
<b>3.7. IMAGERIE PAR NANOSIMS .....</b>	<b>95</b>
<b>4. ANALYSES STATISTIQUES.....</b>	<b>99</b>
<b>CHAPITRE III. APPROCHE METHODOLOGIQUE ET ANALYTIQUE DE LA NANOSIMS .....</b>	<b>101</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>103</b>
<b>2. METHODOLOGIE ET ACQUISITION DES DONNEES DE NANOSIMS .....</b>	<b>103</b>

<b>2.1. IDENTIFICATION DES ZONES D'INTERETS.....</b>	<b>104</b>
2.1.1. AGREGATS DE SOL.....	104
2.1.2. RACINES DE RAY-GRASS.....	105
<b>2.2. TRAITEMENT DES IMAGES DE NANOSIMS.....</b>	<b>107</b>
2.2.1. LES REGIONS D'INTERET (ROIS) .....	107
2.2.2. LINESCANS .....	109
2.2.3. IMAGE COMPOSITE.....	110
2.2.4. BIAIS POTENTIEL LORS DE L'ANALYSE DES AGREGATS DE SOL.....	111
<b>3. RESULTATS &amp; DISCUSSION .....</b>	<b>112</b>
3.1. ANALYSES DES AGREGATS DE SOL A L'ECHELLE MICROMETRIQUE. ....	112
3.2. ENRICHISSEMENT EN <sup>13</sup> C DE LA RACINE ET DE SON ENVIRONNEMENT PROCHE. ....	116
3.3. LOCALISATION DU <sup>13</sup> C DANS LA « RHIZOSPHERE » A L'ECHELLE MICROMETRIQUE.....	118
3.3.1. IMAGES NANOSIMS POUR L'ECHANTILLON A 14 JOURS (T14_1).....	118
3.3.2. IMAGES NANOSIMS POUR L'ECHANTILLON DE 14 JOURS (T14_2) .....	121
<b>4. CONCLUSION.....</b>	<b>125</b>
<b>CHAPITRE IV. DYNAMIQUE DES HAP ET DES COMPOSES ORGANIQUES DERIVES DANS UN MESOCOSME SOL-PLANTE CONTAMINE AU <sup>13</sup>C-PHENANTHRENE.....</b>	<b>127</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>132</b>
<b>2. MATERIALS &amp; METHODS.....</b>	<b>134</b>
2.1. SOIL-PLANT MESOCOSMS .....	134
2.2. ORGANIC AND ISOTOPIC ANALYSES .....	135
2.3. ELEMENTAL MAPPING ANALYSES IN THE ROOTS .....	136
2.4. STATISTICAL ANALYSES.....	137
<b>3. RESULTS.....</b>	<b>138</b>
3.1. PHENANTHRENE CONCENTRATIONS IN PLANTED AND NON-PLANTED MESOCOSMS.....	138
3.2. <sup>13</sup> C-ENRICHMENT AND DISTRIBUTION IN THE PLANTED AND NON-PLANTED MESOCOSMS.....	139
3.3. MAPPING OF <sup>13</sup> C ENRICHMENT IN RYEGRASS ROOTS .....	142
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>144</b>
4.1. EFFECT OF THE RHIZOSPHERE ON PHENANTHRENE DEGRADATION .....	144
4.2. DYNAMICS OF PHENANTHRENE CARBON IN THE PLANT-SOIL MESOCOSMS .....	145
4.3. DETERMINATION OF <sup>13</sup> C HOTSPOTS AND LOCALIZATION OF <sup>13</sup> C IN RYEGRASS ROOTS.....	146
<b>5. CONCLUSION.....</b>	<b>146</b>
<b>CHAPITRE V. IDENTIFICATION ET LOCALISATION DES COMPOSES ORGANIQUES ISSUS DU <sup>13</sup>C-PHE DANS LE SOL RHIZOSPHERIQUE.....</b>	<b>149</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>151</b>
<b>2. RESULTATS .....</b>	<b>153</b>

<b>2.1. ANALYSE DES COMPOSES HYDROSOLUBLES ISSUS DU <sup>13</sup>C-PHE</b> .....	<b>153</b>
2.1.1. ENRICHISSEMENT ISOTOPIQUE DU RESIDU DE SOL « EAU » .....	153
2.1.2. ANALYSE PAR <sup>13</sup> C-RMN LIQUIDE A PARTIR DES EXTRAITS AQUEUX DU SOL.....	154
<b>2.2. ANALYSE DES COMPOSES ISSUS DU <sup>13</sup>C-PHE DANS LES FRACTIONS DENSIMETRIQUES DES SOLS TEMOINS ET ENRICHIS.</b> .....	<b>155</b>
2.2.1. IDENTIFICATION DES ASSOCIATIONS ORGANO-MINERALES.....	156
2.2.2. REPARTITION DU DU <sup>13</sup> C-PHE DANS LE SOL ET DANS LES FRACTIONS .....	161
2.2.3. NATURE DES PRODUITS DE DEGRADATION DANS LES FRACTIONS DE SOL PAR <sup>13</sup> C-RMN ET TD/PYGCMS.....	162
<b>2.3. ANALYSE PAR IRMS (<math>\Delta^{13}\text{C}</math>) DES EXTRAITS D'ADN OBTENUS A PARTIR DU SOL BRUT.....</b>	<b>165</b>
<b>3. DISCUSSION</b> .....	<b>166</b>
<b>3.1. REPARTITION DU <sup>13</sup>C-PHE DANS LA MO LIBRE ET LES MO ASSOCIEES AUX MINERAUX</b> .....	<b>166</b>
<b>3.2. IDENTIFICATION DES COMPOSES MARQUES ISSUS DU <sup>13</sup>C-PHE DANS LE SOL</b> .....	<b>168</b>
3.2.1. IDENTIFICATION DES COMPOSES MARQUES ASSOCIES A LA MO LIBRE.....	168
3.2.2. IDENTIFICATION DES COMPOSES MARQUES APRES EXTRACTION A « L'EAU CHAUDE » DU RESIDU DCM.	170
<b>4. CONCLUSION</b> .....	<b>171</b>
<b>CHAPITRE VI. INFLUENCE DES ASSOCIATIONS ORGANO-MINERALES DANS LA RETENTION DES HAP DANS LES SOLS POLLUES</b> .....	<b>173</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>175</b>
<b>2. RESULTATS</b> .....	<b>177</b>
2.1. REPARTITION MASSIQUE DES FRACTIONS DENSIMETRIQUES .....	177
2.2. IDENTIFICATION DES PHASES MINERALES (DRX) .....	178
2.3. ESTIMATION DES SURFACES SPECIFIQUES.....	181
2.4. DISTRIBUTION DU CARBONE ( $C_{\text{TOTAL}}$ ET $C_{\text{OT}}$ ) ET DE L'AZOTE (N).....	182
2.5. REPARTITION DES 16 HAP DANS LE SOL BRUT ET LES FRACTIONS DENSIMETRIQUES.....	185
<b>3. DISCUSSION</b> .....	<b>190</b>
3.1. PERTES DE MATIERES DUES AU FRACTIONNEMENT DENSIMETRIQUE.....	190
3.2. CARACTERISATION DES ASSOCIATIONS ORGANO-MINERALES .....	191
3.2.1. MO NON LIEE AUX MINERAUX .....	191
3.2.2. MO ASSOCIEES AUX DIFFERENTES PHASES MINERALES DU SOL .....	191
3.3. DISTRIBUTION DES HAP DANS LA MO LIBRE ET ASSOCIEE AUX MINERAUX.....	192
3.4. LOCALISATION DES HAP ISSUS DE LA CONTAMINATION FRAICHE .....	195
<b>4. CONCLUSION</b> .....	<b>195</b>
<b>CHAPITRE VII. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>197</b>
<b>1. DEVENIR DU PHE ET DES PRODUITS ISSUS DE SA TRANSFORMATION DANS LE SOL ET DANS LA RHIZOSPHERE</b> .....	<b>199</b>
1.1. LOCALISATION DU C ISSU DU PHE LES MICROORGANISMES DE LA RHIZOSPHERE.....	200

<b>1.2. REPARTITION DU PHE ET DES COMPOSES ISSUS DE SA TRANSFORMATION DANS LE SOL .....</b>	<b>202</b>
<b>2. IDENTIFICATION DES COMPOSES ORGANIQUES ISSUS DE LA TRANSFORMATION DU PHE.....</b>	<b>203</b>
<b>3. INFLUENCE DES PHASES MINERALES DANS LA DISTRIBUTION ET LA RETENTION DES HAP.....</b>	<b>204</b>
<b>3.1. UNE LOCALISATION DIFFERENTE DES HAP ANCIENS ET FRAICHEMENT AJOUTES DANS UN SOL INDUSTRIEL .....</b>	<b>204</b>
<b>3.2. LE PHE AJOUTE ARTIFICIELLEMENT EST LIE AUX ASSOCIATIONS ORGANO-MINERALES DANS LA RHIZOSPHERE.....</b>	<b>206</b>
<b>3.3. IMPORTANCE DE LA CARACTERISATION DES ASSOCIATIONS ORGANO-MINERALES POUR COMPRENDRE LA DISTRIBUTION ET LA LOCALISATION DES HAP .....</b>	<b>206</b>
<b>3.4. INTERETS DE L'UTILISATION D'UNE METHODE DE FRACTIONNEMENT DENSIMETRIQUE .....</b>	<b>207</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>213</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>247</b>



# Tables des illustrations

## -Figures-

<b>Figure I-1.</b> Exemples de composés aromatiques polycycliques oxygénés (CAP-O) et azotés (CAP-N) retrouvés dans les sols pollués (Dagois, 2015).....	25
<b>Figure I-2.</b> Exemples d'hydrocarbures aliphatiques présents dans les sols de cokerie.....	26
<b>Figure I-3.</b> Schéma des principaux processus régissant le devenir des HAP dans les sols .....	27
<b>Figure I-4.</b> Les 3 principales voies métaboliques pour l'oxydation des HAP par les bactéries et champignons (Bamforth and Singleton, 2005).....	29
<b>Figure I-5.</b> Voies biochimiques de dégradation du phénanthrène par une bactérie aérobie produisant les métabolites suivants : (1), <i>cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrophenanthrene</i> (2), <i>1,2-dihydroxyphenanthrene</i> (3), <i>2-[(E)-2-carboxyvinyl]-1-naphthoic acid</i> (4), <i>trans-4-(2-hydroxynaph-1-yl)-2-oxobut-3-enoic acid</i> (5), <i>5,6-benzocoumarin</i> (6), <i>2-hydroxy-1-naphthoic acid</i> (7), <i>naphthalene-1,2-dicarboxylic acid</i> (8), <i>cis-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrophenanthrene</i> (9), <i>3,4-dihydroxyphenanthrene</i> (10), <i>1-[(E)-2-carboxyvinyl]-2-naphthoic acid</i> (11), <i>trans-4-(1-hydroxynaph-2-yl)-2-oxobut-3-enoic acid</i> (12), <i>1-hydroxy-2-naphthoic acid</i> (13), <i>7,8-benzocoumarin</i> (14), <i>1,2-dihydroxynaphthalene</i> (15), <i>2-hydroxy-2H-chromene-2-carboxylic acid</i> (16), <i>trans-o-hydroxybenzalpyruvic acid</i> (17), <i>salicylaldehyde</i> (18), <i>salicylic acid</i> (19), <i>trans-2-carboxybenzalpyruvic acid</i> (20), <i>2-carboxybenzaldehyde</i> (21), <i>o-phthalic acid</i> (22), <i>protocatechuic acid</i> (23), <i>cis-9,10-dihydroxy-1,2-dihydrophenanthrene</i> (24), and <i>2,2-diphenic acid</i> .....	31
<b>Figure I-6.</b> Voie métabolique de dégradation du phénanthrène proposée pour les champignons utilisant les monooxygénases P450.....	32
<b>Figure I-7.</b> Schéma illustrant les différents mécanismes de sorption des HAP par les particules de sol adapté de Okere and Semple (2012).....	34
<b>Figure I-8.</b> Types d'interactions possibles entre les MO et les minéraux selon le modèle proposé par Kleber et al. 2007.....	40
<b>Figure I-9.</b> Schéma présentant les 4 niveaux d'organisation des agrégats dans les sols d'après (Tisdall et al., 1982).....	42
<b>Figure I-10.</b> Diagramme présentant la distribution des minéraux dans chaque fraction granulométrique (terre fine) du sol (Gobat et al., 2010).....	45
<b>Figure I-11.</b> Phénomène de vieillissement de la pollution « aging » (d'après Dagois, 2015).....	46
<b>Figure I-12.</b> Schéma du principe physique de la NanoSIMS (adapté de Hoppe et al., 2013). <i>Les ions I entraînent l'éjection d'atomes et petites molécules parmi lesquelles une partie est ionisée. Les ions secondaires sont ensuite transférés à un spectromètre de masse et comptés les uns après les autres.</i> .....	59
<b>Figure I-13.</b> Schéma de synthèse des objectifs de recherche et des verrous à lever au cours de ce travail.....	67
<b>Figure II-1.</b> Localisation du site de la station expérimentale du GISFI à Homécourt, et de la forêt de Joeuf.....	71
<b>Figure II-2.</b> Profil du sol forestier de Joeuf.....	72

<b>Figure II-3.</b> Schéma général du plan expérimental de l'étude pour les dispositifs marqués au $^{13}\text{C}$ -PHE .....	76
<b>Figure II-4.</b> Echantillonnage du sol et de la biomasse végétale lors de l'expérimentation avec du $^{13}\text{C}$ -PHE pour les analyses organiques .....	77
<b>Figure II-5.</b> Stabilisation des sols HOM et HOM <sub>+HAP</sub> .....	79
<b>Figure II-6.</b> Schéma du remplissage des cellules ASE .....	81
<b>Figure II-7.</b> Schéma des traitements physiques, chimiques et techniques analytiques utilisés sur les échantillons de sol lors de l'expérimentation avec du $^{13}\text{C}$ -PHE .....	82
<b>Figure II-8.</b> Coupures densimétriques choisies en fonction des phases minérales majoritaires pour le fractionnement du sol d'Homécourt. ....	83
<b>Figure II-9.</b> Schéma du protocole expérimental de séparation densimétrique. ....	86
<b>Figure II-10.</b> Schéma d'un analyseur élémentaire et d'un spectromètre de masse à ratio isotopique (Muccio & Jackson, 2008).....	92
<b>Figure II-11.</b> Schéma du principe de la NanoSIMS CAMECA 50 (adapté de M.Steinhauser et al. NATURE 2012).....	96
<b>Figure II-12.</b> Racines de Ray-grass enrobées.....	97
<b>Figure II-13.</b> Agrégats de sol enrobés et rectifiés. ....	98
<b>Figure II-14.</b> Schéma représentant l'extraction d'ions secondaires par balayage de la surface d'un échantillon à l'aide d'un faisceau d'ions primaires ( $\text{Cs}^+$ ).....	98
<b>Figure III-1.</b> Agrégat de sol enrobé dans une résine époxy et observé au microscope optique.....	104
<b>Figure III-2.</b> Agrandissement au microscope optique d'une partie d'un agrégat de sol enrobé. ....	104
<b>Figure III-3.</b> Echantillon de racines de ray-grass enrobées qui a été rectifié par un polissage au couteau diamant. ....	105
<b>Figure III-4.</b> Exemple de sélection de ROIs identifiées par des chiffres sur des images d'ions secondaires obtenues pour un échantillon de racines avec Image J (open-source). ....	108
<b>Figure III-5.</b> Exemple de LINESCAN : le segment (flèche blanche) et les données générées (sous la forme d'une représentation graphique) pour l'ion secondaire $^{13}\text{C}^-$ (échantillon de racines $^{13}\text{C}$ -PHE, à 14 jours) sont représentés sur l'image. ....	109
<b>Figure III-6.</b> Image composite obtenue par la superposition des images d'ions secondaires $^{12}\text{C}^-$ , $^{13}\text{C}^-$ , $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ et $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$ . ....	110
<b>Figure III-7.</b> Images d'électrons secondaires acquises après pulvérisation de surface d'agrégats de sol .....	111
<b>Figure III-8.</b> Répartition des ions secondaires $^{12}\text{C}^-$ , $^{13}\text{C}^-$ , le $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ , $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}^-$ , $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$ (de gauche à droite) au travers des images NanoSIMS obtenues pour deux agrégats de sol échantillonnés à 7 jours. ....	112
<b>Figure III-9.</b> Images composites obtenues par la superposition des images d'ions secondaires (a) $^{16}\text{O}^-$ (blanc) $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ (vert) (b) $^{16}\text{O}^-$ (blanc) et $^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^-$ (bleu) (c) $^{16}\text{O}^-$ (blanc) et $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$ (rouge) pour un agrégat de sol à T0.....	115
<b>Figure III-10.</b> Valeurs des rapports isotopiques pour chaque ROI (A) déterminées sur les images NanoSIMS acquises pour les racines témoins ( $^{12}\text{C}$ -PHE) et enrichies ( $^{13}\text{C}$ -PHE) à 7 et à 14 jours. Les résultats sont présentés sous la forme d'une boîte à moustaches (B) ou d'histogrammes (C). Les différentes lettres (a, b) indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les échantillons. ....	117
<b>Figure III-11.</b> Analyse et traitement des données de NanoSIMS pour l'échantillon (T14_1). (A) Cartes des ions secondaires $^{12}\text{C}^-$ , $^{13}\text{C}^-$ , $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ , $^{32}\text{S}^-$ et $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$ (B) Image composite issue de la superposition des images des ions $^{12}\text{C}^-$ , $^{13}\text{C}^-$ , $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ et $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$ . (C) Linescan représentant la distribution des éléments $^{12}\text{C}^-$ , $^{13}\text{C}^-$ , $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ et $^{32}\text{S}^-$ le long du segment tracé sur les images. ....	120

<b>Figure III-12.</b> Images composites et linescans obtenus après traitement des images NanoSIMS 90 x 90 µm acquises pour l'échantillon T14_2. L'image composite est présentée à deux reprises, afin d'afficher sur chacune un des deux linescans tracés (1 et 2). Les graphiques présentent la distribution des rapports isotopiques ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ) et élémentaires ( $^{12}\text{C}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ ) le long des segments 1 et 2. ....	121
<b>Figure III-13.</b> Cartes élémentaires acquises en NanoSIMS pour l'échantillon «enrichi» T14_2. (A) Une large zone est d'abord balayée produisant des images de 90 X 90 µm. A partir de ces images rendant visible la racine entière (en vue transversale), certaines zones ont été zoomées pour donner des images à champ réduit de 25 X 25 µm (a et b).....	122
<b>Figure III-14.</b> Images NanoSIMS et linescans obtenues après balayage de la zone a (Figure III-13a). ....	123
<b>Figure III-15.</b> ROIs et valeurs des rapports élémentaires associés pour chaque classe de ROIs déterminée: Hotspot, Racine, Minéral et Résine. ....	124
<b>Figure IV-1.</b> Extractable concentrations of phenanthrene (PHE) ( $\text{mg kg}^{-1}$ of soil) in planted and non-planted mesocosms at different time-points over a 21-day period. Means $\pm$ SD, n = 4. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the sampling times. ....	138
<b>Figure IV-2.</b> $^{13}\text{C}$ dynamics after $^{13}\text{C}$ -PHE spiking in non-planted (left) and planted (right) mesocosms at different time-points over a 21-day period. (a) $^{13}\text{C}$ enrichment ( $E^{13}\text{C} \%$ ) in the plant and soil compartments. Means $\pm$ SD, n = 4. $^{13}\text{C}$ enrichment was calculated from $\delta^{13}\text{C}$ data obtained by EA-IRMS. (b) $^{13}\text{C}$ distribution in the mesocosm compartments (PAH extract, residual soil, plant, and C loss). Results are expressed as percentages of the $^{13}\text{C}$ -PHE concentrations initially added in the soil. The plant compartment gathers root and shoot data. PAH extract concentrations were calculated as the difference between bulk and residual soil concentrations. ....	140
<b>Figure IV-3.</b> NanoSIMS elemental maps of $^{12}\text{C}^-$ , $^{13}\text{C}^-$ , $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ , $^{32}\text{S}^-$ and $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$ from labeled ryegrass roots after 14 days. The $90 \times 90\text{-}\mu\text{m}^2$ images are cross views of whole roots with adherent soil particles. A composite image (bottom right) was obtained by overlaying the $^{12}\text{C}^-$ , $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ and $^{13}\text{C}^-$ images. Three areas of interest (bordered in white) with higher $^{13}\text{C}$ content were identified. NanoSIMS data were analyzed using Winimage software.....	142
<b>Figure IV-4.</b> NanoSIMS composite image and linescan obtained from root tissue after 14 days. The zone is located inside the white square of Figure 3. (a) Composite $25 \times 25\text{-}\mu\text{m}^2$ image with hotspots reflecting the $^{13}\text{C}$ -enrichment (red) obtained by overlaying $^{12}\text{C}^-$ , $^{13}\text{C}^-$ , $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ and $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$ (white) ion species images. (b) A white segment was drawn through these hotspots (H) and the root (R) tissue to obtain the linescan profiles. They provided information on the elemental distribution of nitrogen, sulfur, and labeled and unlabeled carbon, and concerned $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ relatively to $^{32}\text{S}$ and $^{13}\text{C}$ relatively to $^{12}\text{C}$ (top to bottom). ....	143
<b>Figure V-1.</b> Produits de dégradation du $^{13}\text{C}$ -PHE et contribution potentielle de ces produits dans la formation des résidus liés non extractible du sol d'après (Kästner et al., 1999). ....	152
<b>Figure V-2.</b> Concentrations en carbone (a), azote (b), rapport C/N (c) et concentrations en $^{13}\text{C}$ -PHE (d) des résidus de sol "DCM" et "EAU". <i>Différences significatives entre les deux traitements « DCM » et « EAU » : (*) <math>p \leq 0,05</math> (**) <math>p \leq 0,01</math>.</i> ....	153
<b>Figure V-3.</b> Comparaison des spectres de $^{13}\text{C}$ -RMN à l'état liquide pour les extraits aqueux obtenus lors de l'extraction à l'eau chaude des résidus de sol (DCM) non marqué ( $^{12}\text{C}$ , trait pointillé) et marqué ( $^{13}\text{C}$ , trait plein) à 14 jours. ....	155
<b>Figure V-4.</b> Répartition massique des fractions densimétriques à T0 et à T14. ....	156
<b>Figure V-5.</b> Diffractogrammes de rayons X obtenus pour le sol non fractionné et les fractions denses $1.9\text{-}2.7$ et $2.7 \text{ g.cm}^{-3}$ . ....	157
<b>Figure V-6.</b> (A) Teneurs en carbone et (B) en azote total ( $\text{mg.g sol}^{-1}$ ) et (C) rapports C/N pour le sol non fractionné et les différentes fractions densimétriques à T0 (en clair) et T14 (en foncé). <i>Les</i>	

*chiffres situés au dessus de chaque barre d'histogramme représentent la proportion moyenne de chaque élément dans les fractions par rapport à la concentration initiale (sol non-fractionné). Les différences significatives ( $p < 0,05$ , ANOVA2) identifiées entre les sols sont annotées par des lettres (a, b, c). Aucune différence significative n'a été observée entre les temps T0 et T14. .... 159*

**Figure V-7.** Distribution du  $^{13}\text{C}$  dans le sol non fractionné (bulk et résidu) et les différentes fractions densimétriques (exprimées en  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ). Les valeurs de pourcentage représentées au dessus de chaque barre d'histogramme expriment la proportion de  $^{13}\text{C}$  par rapport à la quantité initiale mesurée après la contamination par le  $^{13}\text{C}$ -PHE (T0). Les différences significatives ( $p < 0,05$ , Anova2) observées entre les deux temps sont données par des lettres et entre les différentes fractions densimétriques par (\*). ..... 161

**Figure V-8.** Spectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN à l'état solide pour les échantillons  $^{13}\text{C}$ -T0,  $^{12}\text{C}$ - et  $^{13}\text{C}$ -T14 de la fraction de densité 1-1.9  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Les régions principales identifiées sont attribuées aux groupements suivants : C-alkyle (0-45 ppm), O-alkyle (45-110 ppm), aromatique (110-160 ppm), carboxylique (160-210) (Kögel-Knabner, 1997). ..... 162

**Figure V-9.** Comparaison des chromatogrammes obtenus après thermodésorption pour les échantillons de sol constituant la fraction 1-1.9 non marqué ( $^{12}\text{C}$ -PHE) à 0 et 14 jours (les différents pics ont été identifiés Figure V-10). ..... 163

**Figure V-10.** Comparaison des chromatogrammes obtenus après thermodésorption des fractions (A) 1-1.9 (B) 1.9-2.7 issues de l'échantillon de sol non marqué ( $^{12}\text{C}$ -PHE) à 14 jours. .... 164

**Figure V-11.** Déviation isotopique ( $\delta^{13}\text{C}$ ) pour les extraits d'ADN témoin (trait clair) et enrichi (trait foncé). ..... 165

**Figure V-12.** Exemple de composés organiques constitutifs des cellules bactériennes susceptibles d'être retrouvés dans l'extrait aqueux analysé en  $^{13}\text{C}$ -RMN liquide. .... 171

**Figure VI-1.** Schéma résumant les points essentiels de l'expérimentation sur le sol industriel. .... 176

**Figure VI-2.** Répartition en masse des différentes fractions densimétriques pour la terre d'Homécourt (HOM) et la même terre enrichie en HAP avec un extrait organique (HOM<sub>+HAP</sub>). ..... 177

**Figure VI-3.** Diffractogramme des rayons X obtenu pour le sol d'Homécourt (HOM<sub>+HAP</sub>) non-fractionné. .... 178

**Figure VI-4.** Diffractogrammes des rayons X obtenus pour les différentes fractions densimétriques du sol d'Homécourt (HOM<sub>+HAP</sub>). ..... 179

**Figure VI-5.** Distribution du carbone total (histogramme plein) et du carbone organique total (histogramme motif) dans le sol non fractionné avant (T0) et après (T15) stabilisation et dans les fractions densimétriques (exprimées en  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) pour les sols HOM (gris) et HOM<sub>+HAP</sub> (noir). (%) Les valeurs de pourcentage représentent la part de chaque fraction pour chaque condition par rapport aux teneurs initiales. .... 182

**Figure VI-6.** Distribution de l'azote total dans le sol non fractionné avant (T0) et après (T15) stabilisation et entre les fractions densimétriques pour les sols HOM (gris) et HOM<sub>+HAP</sub> (noir). (%) Les pourcentages représentent la part de chaque fraction pour chaque sol/terre par rapport aux teneurs initiales. (\*) Différences significatives ( $p < 0.05$ ) observées entre les différentes fractions densimétriques. .... 182

**Figure VI-7.** Rapports C/N obtenus pour le sol non fractionné (T0 et à T15) et pour les différentes fractions densimétriques pour les sols HOM et HOM<sub>+HAP</sub>. (a,b) Différences significatives ( $p < 0.05$ , test ANOVA 2) observées entre chacune des fractions densimétriques ..... 183

**Figure VI-8.** Teneurs totales en 16 HAP pour les sols non fractionnés HOM (gris) et HOM<sub>+HAP</sub> (noir) (après la phase de stabilisation) et pour les différentes fractions densimétriques avec pour chacune les phases minérales associées identifiées par DRX. Deux lettres différentes indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ , test ANOVA2) (Majuscules) entre les sols non fractionnés

<i>(T15) (minuscules) entre les différentes fractions. (%) indique la proportion que représente chaque fraction par rapport à la teneur totale en 16HAP initiale. ....</i>	185
<b>Figure VI-9.</b> Répartition des HAP dans les sols non fractionnés HOM (gris) et HOM <sub>+HAP</sub> (noir) après la phase de stabilisation (T15). La valeur placée au dessus de chaque barre donne la proportion relative (%) de chacun des HAP dans les sols. Les différences significatives ( $p < 0,05$ ) observées entre les sols sont annotées par (*). (NAP : naphthalène, ACY : acénaphthylène, ACE : acénaphthène, FLU : fluorène, PHE : phénanthrène, ANT : anthracène, FLT : fluoranthène, PYR : pyrène, BaANT : benzo(a)anthracène, CHY : chrysène, BbFLT : benzo(b)fluoranthène, BkFLT : benzo(k)fluoranthène, BaPYR : benzo(a)pyrène, dBahAN : dibenzo[ah]anthracène, BghiPL : benzo[ghi]pérylène, IcdPYR : Indéno[1,2,3-cd]pyrène).....	187
<b>Figure VI-10.</b> Répartition des 16 HAP au sein de chaque fraction densimétrique des sols HOM et HOM <sub>+HAP</sub> . La proportion relative (%) de chacun des 16 HAP dans les différentes fractions est donnée par le chiffre présent au dessus de chaque barre d'histogramme. Les différences significatives ( $p \leq 0,05$ ) entre les deux sols/terres sont indiquées par * .....	188
<b>Figure VII-1.</b> Schéma d'une section de racine représentant la structure de la rhizosphère, et le devenir probable du <sup>13</sup> C-PHE dans la rhizosphère (adapté de McNear, (2013) .....	201
<b>Figure VII-2.</b> Synthèse des principales conclusions obtenues au cours de ce travail de thèse. ....	208

### -Tableaux-

<b>Tableau I-1.</b> Propriétés physico-chimiques des 16 HAP listés comme prioritaires par l'US-EPA (Rapport INERIS, 2005).....	23
<b>Tableau I-2.</b> Caractéristiques des principaux minéraux du sol (Bailey and White, 1964).....	38
<b>Tableau I-3.</b> Bandes caractéristiques retrouvées pour les spectres RMN du <sup>13</sup> C (Wilson et al., 1987).....	57
<b>Tableau II-1.</b> Caractéristiques physico-chimiques des échantillons prélevés sur le site industriel (Homécourt) et du sol forestier (Joeuf).....	73
<b>Tableau II-2.</b> Conditions d'extraction des composés organiques au DCM et à l'eau ultrapure .....	80
<b>Tableau II-3.</b> Phases minérales dominantes associées à la minéralogie du sol (a) d'Homécourt et (b) de Joeuf.....	83
<b>Tableau II-4.</b> Estimation des temps de centrifugations pour chaque densité de solution. ....	85
<b>Tableau III-1.</b> Echantillons issus de l'expérimentation <sup>13</sup> C-PHE analysés en NanoSIMS.....	106
<b>Tableau V-1.</b> Principaux minéraux associés aux fractions densimétriques <1.9, 1.9-2.7, >2.7 g.cm <sup>-3</sup> (✓=identifié, -= non identifié).....	158
<b>Tableau V-2.</b> Intensité du signal (%) pour les pics principaux des spectres <sup>13</sup> C-T0, <sup>12</sup> C-T14 et <sup>13</sup> C-T14 de la fraction 1-1.9 et rapports de pics des composés oxygénés/aromatiques. ppm = unité du déplacement chimique ; oxy = oxygénés et arom = aromatique.....	163
<b>Tableau VI-1.</b> Phases minérales observées dans les différentes fractions densimétriques du sol HOM <sub>+HAP</sub> après diffractions des rayons X.....	180
<b>Tableau VI-2.</b> Valeurs des surfaces spécifiques déterminées par la méthode BET pour les sols non-fractionnés HOM et HOM+HAP et les fractions densimétriques. L'écart (±) donné ici correspond à l'erreur commise lors du traitement des données par application de la méthode BET.....	181

### - Tables -

<b>Table IV-1.</b> $\delta^{13}\text{C}$ values (%), total C contents (mg.g <sup>-1</sup> soil) and <sup>13</sup> C concentrations obtained for soil and plant ( $\mu\text{g C g}^{-1}$ soil and $\mu\text{g C g}^{-1}$ DM respectively) in non-planted (NP) and planted (P)
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

mesocosms with  $^{12}\text{C}$  (control) and  $^{13}\text{C}$  (enriched) spiked soil. The  $\delta^{13}\text{C}$  values and C contents were measured by EA-IRMS and the  $^{13}\text{C}$  concentrations were calculated from the measured data.

.....	141
<b>Table IV-2.</b> $^{12}\text{C}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ , $^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ and $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}/^{12}\text{C}$ ratios in the hotspots, root tissues, soil, and resin identified in Figure 4. Mean ratios ( $\pm\text{SD}$ ) were extracted from Regions Of Interest (ROIs) using OpenMIMS plugin in the freeware package Image J. * ( $p<0.10$ ), ** ( $p<0.05$ ), *** ( $p<0.001$ ), indicate significant differences between ROI classes according to Wilcoxon rank-sum test.....	144

## -Annexes-

<b>Annexe II.1.</b> Estimation des temps de sédimentation pour le fractionnement densimétrique. ....	251
<b>Annexe II 2.</b> Protocole NPP (Nombre le Plus Probable) détaillé.....	253
<b>Annexe V-1.</b> Teneurs en $\text{C}_{\text{total}}$ , N, $\delta^{13}\text{C}$ , $^{13}\text{C}_{\text{conc}}$ (moyenne $\pm$ SD) dans les différentes fractions densimétriques ( $\text{mg.g}^{-1}$ fraction, $\mu\text{g.g}^{-1}$ fraction pour la $^{13}\text{C}_{\text{conc}}$ et $\text{mg.g}^{-1}$ sol ou $\mu\text{g.g}^{-1}$ sol pour la $^{13}\text{C}_{\text{conc}}$ ) et dans le sol non fractionné ( $\text{mg.g}^{-1}$ sol ou $\mu\text{g.g}^{-1}$ sol pour la $^{13}\text{C}_{\text{conc}}$ ), rapport C/N et valeurs de surface spécifique ( $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ sol) du sol non fractionné à T0 et des fractions et répartition en masse ( $\%\text{m}_{\text{fraction}}$ ), et en $^{13}\text{C}$ ( $\%\text{C}_{\text{fraction}}$ ) dans chaque fraction. Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre les fractions de sol (a, b) et entre les temps (a, A) ( $p<0,05$ ). ....	255
<b>Annexe VI-1.</b> Teneurs en $\text{C}_{\text{total}}$ , N, COT et en HAP totaux (moyenne $\pm$ SD) dans les différentes fractions densimétriques ( $\text{mg.g}^{-1}$ fraction et $\text{mg.g}^{-1}$ sol sec ou $\text{mg.kg}^{-1}$ sol pour les 16HAP) et dans le sol non fractionné ( $\text{mg.g}^{-1}$ sol ou $\text{mg.kg}^{-1}$ sol pour les HAP), rapport C/N et valeurs de surface spécifique ( $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ sol) des sols non fractionnés et des fractions et répartition en masse ( $\%\text{m}_{\text{fraction}}$ ), en C ( $\%\text{C}_{\text{fraction}}$ ), en N ( $\%\text{N}_{\text{fraction}}$ ), en COT ( $\%\text{COT}_{\text{fraction}}$ ) et HAP ( $\%\text{HAP}_{\text{fraction}}$ ) dans chaque fraction. Les valeurs sont données pour les deux sols (HOM et HOM+HAP). Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre les fractions de sol (a, b) et entre les sols (a,A) ( $p<0,05$ ). ....	257
<b>Annexe VI-2.</b> Diffractogrammes des rayons X obtenus (par DRX) pour les fractions densimétriques issues du sol d'Homécourt (HOM). ....	258

# Liste des abréviations

$^{13}\text{C}$  : Isotope 13 du carbone

$^{13}\text{C}$ -PHE :  $^{13}\text{C}$ -phénanthrène

ACN : Acétonitrile

ADN : Acide désoxyribonucléique

Al : Aluminium

ASE : Accelerated solvent extraction

BC : Black carbon

C : Carbone

CAP : Composés aromatiques polycycliques

CEC : Capacité d'échange cationique

COT : Carbone organique total

DCM : Dichlorométhane

DRX : Diffraction aux rayons X

Fe : Fer

FI : Friche industrielle

FISH : Fluorescence in situ hybridation

GC/MS : Gas chromatography / Mass spectrometry

GISFI : Groupement d'intérêt scientifique sur les friches industrielles

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

HOM : Homécourt

$K_{ow}$  : coefficient de partage octanol-eau

MET : Microscope électronique à Transmission

MO : Matière organique

N : azote

NP : non-planté

NPP : Nombre le plus probable

O : Oxygène

P : Planté

PHE : Phénanthrène

Py : Pyrolyse

RG : Ray-Grass

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROI : Région d'intérêt

S : Soufre

SF : Sol forestier

SIMS : Secondary ions mass spectrometry

SIP : Stable Isotope Probing

SPT : Sodium polytungstate

TD : Thermodesorption

UHPLC : Ultra high performance liquid chromatography

UV : Ultraviolet

# Introduction générale

Les activités humaines peuvent causer de profondes modifications des sols affectant leurs propriétés biologiques, physiques et chimiques. Les friches industrielles représentent un cas extrême de sols anthropisés apparues en Europe, et y compris dans le Nord Est de la France, à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle suite au déclin industriel.

La Lorraine a un lourd passé industriel avec 372 sites pollués (ou potentiellement pollués) recensés soit 5,8% des sites et sols répertoriés en France (<http://basol.developpement-durable.gouv.fr>) qui représentent plus de 6000 hectares de terre contaminée. La cokerie, usine de transformation du charbon en coke, représente une des activités principales ayant eu lieu en Lorraine. De nombreux sites ayant abrité des usines de cokerie ont généré des sols fortement contaminés majoritairement par des métaux lourds et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Ahn et al., 2005; Smith et al., 2011). Il existe plus d'une centaine de HAP connus mais 16 d'entre eux ont été classés comme polluants prioritaires par l'Agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA) (Hartmann, 1996) car ils sont reconnus comme étant toxiques et potentiellement cancérigènes (Chiapusio et al., 2007). Par conséquent, ils présentent des risques majeurs pour la santé humaine et les écosystèmes, d'où l'importance de limiter ou d'éliminer ces risques et de restaurer ces sites. De fait, ces contaminants font l'objet depuis des décennies de nombreuses études environnementales (Howsam and Jones, 1998) afin de comprendre les mécanismes régissant leur devenir et leur disponibilité conditionnant leur impact sur les milieux.

Pour appréhender le fonctionnement de ces sols historiquement contaminés et adopter la meilleure stratégie de gestion, il est donc important de comprendre et de prédire le devenir des HAP. Ces contaminants sont soumis à de nombreux processus physiques, chimiques et biologiques dès leur entrée dans les sols (Okere and Semple, 2012). Un des mécanismes majeurs contrôlant le comportement des HAP dans les sols est la sorption, résultant d'interactions nombreuses et complexes se produisant entre les polluants et les constituants du sol (Ni et al., 2008). La sorption mais aussi la biodégradation des HAP font parties des processus majeurs gouvernant la dynamique des polluants organiques dans les sols (Magee et al., 1991). Les microorganismes adaptés sont capables de dégrader les HAP par le biais de voies métaboliques variées, mais peuvent aussi les transformer en composés qui peuvent être plus réactifs voire dans certains cas plus toxiques que les composés parents. Ces composés

peuvent se lier plus aisément aux différents constituants du sol pour former des résidus liés (Richnow et al. 1994 ; Kästner et al. 1999).

Parmi les techniques de remédiation des sols contaminés par des HAP, l'utilisation des plantes comme outil de biodépollution est depuis plusieurs années abondamment étudiée. En effet, les plantes permettent d'accroître le développement et l'activité des microorganismes favorisant la dégradation de polluants tels que les HAP. Toutefois, la présence de substrats carbonés apportés par les exsudats racinaires peut aussi limiter le taux de dégradation de ces polluants organiques dans la rhizosphère. Les résultats des études peuvent ainsi apparaître assez contradictoires. Il faut souligner que la plupart des études concernant la rhizodégradation quantifient la dissipation des HAP, c'est-à-dire la part qui est éliminée, mais n'abordent pas la fraction qui n'est pas dégradée. A l'heure actuelle, subsiste encore un manque de connaissances concernant le devenir et la localisation des HAP et des composés issus de leur transformation, dont la nature reste à préciser, qui vont persister dans les sols. Cébron et al. (2011) ont montré qu'environ 30% du carbone issu d'un HAP marqué ajouté dans un sol planté restaient liés au sol.

Ce travail de thèse avait ainsi pour objectif d'améliorer la compréhension de la dynamique des HAP et des composés organiques dérivés dans les sols et dans la rhizosphère. Pour cela deux approches multi-échelles ont été utilisées :

- 🔍 Une approche avec un sol artificiellement contaminé par un HAP modèle marqué au carbone 13, le <sup>13</sup>C-phénanthrène, et planté pour suivre la distribution du HAP marqué dans les différents compartiments du sol et de la plante, mais aussi pour localiser le <sup>13</sup>C provenant du PHE marqué à des échelles fines d'organisation dans la rhizosphère.
- 🔍 Une approche avec un sol historiquement contaminé pour déterminer l'influence des phases minérales dans la rétention des HAP dans ce sol historiquement contaminé avant et après apport d'une contamination fraîche.

Ce manuscrit de thèse se compose de 7 chapitres. Un **premier chapitre** correspond à la synthèse bibliographique qui s'attache à faire un point sur l'état des connaissances actuelles concernant les mécanismes régissant le comportement des HAP dans les sols et la plante afin d'appréhender leur devenir. Dans un premier temps une présentation générale des HAP a été effectuée puis une description des processus auxquels sont soumis les HAP. Ces dernières décennies, ils ont été abondamment étudiés et font l'objet d'une seconde partie. Pour finir les méthodes d'étude permettant de caractériser la matière organique et de localiser des composés marqués à l'échelle du micromètre seront présentées. Le **chapitre II** présente le matériel et

les méthodes utilisés tout au long de ce travail. Le **chapitre III** présente la méthodologie utilisée pour interpréter les différentes images acquises en NanoSIMS et permet d'introduire le **chapitre IV** qui expose les résultats principaux obtenus concernant la distribution et la localisation du  $^{13}\text{C}$  issu du  $^{13}\text{C}$ -PHE à différentes échelles. Ce chapitre a fait l'objet d'une publication parue (Cennerazzo et al. 2017). Le **chapitre V** est dédié à l'identification des composés néoformés issus du polluant marqué dans le sol planté. Le **chapitre VI** se focalise sur l'influence des minéraux sur la rétention des HAP au sein des associations organo-minérales d'un sol historiquement contaminé. Et pour finir, le **chapitre VII** est une synthèse des principaux résultats discutés, aboutissant sur les perspectives de recherche.



# Chapitre I. Etat de l'Art



## 1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

### 1.1. Présentation et origines des HAP

Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) constituent un vaste groupe de polluants organiques apolaires, composés d'atomes de carbone et d'hydrogène dont la structure comprend au moins deux cycles benzéniques fusionnés par des arrangements linéaires, angulaires ou en coin (Lundstedt, 2003). Ils sont ubiquitaires et peuvent donc être retrouvés dans les différents compartiments de l'environnement : atmosphère, eau, sol. Ce dernier représente toutefois le plus grand réservoir avec plus de 90% des HAP totaux retrouvés (Wilcke et al., 2002; Wild and Jones, 1995). Ils sont reconnus comme potentiellement toxiques, et par conséquent présentent des risques pour la santé humaine et les écosystèmes. Pour cela, l'Agence de protection environnementale des USA (US-EPA) a désigné 16 HAP comme polluants prioritaires (**Tableau I-1**) parmi la centaine de composés retrouvés dans l'environnement (Hartmann, 1996).

Les HAP sont principalement issus de la combustion incomplète de matière organique (Chen and Yuan, 2012) et peuvent avoir des origines diverses. En effet, les sources peuvent être :

 **Naturelles** si les composés sont formés à la suite de processus naturels tels que des feux de forêt ou des éruptions volcaniques (Wilson and Jones, 1993). Les concentrations en HAP, dans les sols, associées à des sources naturelles varient entre 0,1 et 1 mg.kg<sup>-1</sup> (Crampon, 2015) mais peuvent atteindre 10 mg.kg<sup>-1</sup> dans les sols de forêt (Krauss et al., 2000).

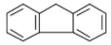
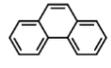
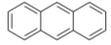
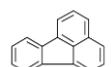
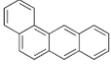
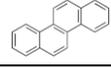
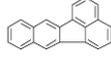
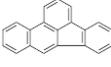
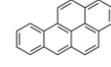
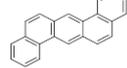
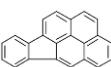
 **Anthropiques** dans le cas où les polluants sont produits par des activités industrielles (cokerie, métallurgie, chauffage domestique, etc.) (Edwards, 1983). Les sources anthropogéniques sont prédominantes par rapport aux sources naturelles, et peuvent être de différents types. En effet, la source de combustion peut être pyrolytique donnant des HAP parents non substitués et lourds, ou pétrogénique produisant des HAP naturels substitués et légers. Les sources anthropiques sont diverses, néanmoins la formation des HAP par pyrolyse est considérée comme étant majoritaire (Menzie et al., 1992). Les teneurs en HAP retrouvées dans les anciens sites industriels varient en fonction de la nature (Juhász and Naidu, 2000) et de la distance de la source de pollution (Gabet, 2004). Les sols contaminés aux HAP peuvent contenir des concentrations inférieures à 100

mg.kg<sup>-1</sup> (Blankenhorn et al., 1992) mais supérieures à 10 g.kg<sup>-1</sup> (Cutright, 1995; Juhasz and Naidu, 2000).

## 1.2. Propriétés physico-chimiques des HAP

Les HAP sont des composés hydrophobes, lipophiles et peu volatils qui diffèrent par leurs propriétés physiques et chimiques (**Tableau I-1**). Ils peuvent être divisés en composés de bas poids moléculaires (HAP de 2 à 3 cycles aromatiques comme le naphthalène et le phénanthrène) et de haut poids moléculaires (de 4 à 6 noyaux : pyrène et benzo(a)anthracène par exemple) (Okere and Semple, 2012). Les HAP peuvent être classés selon leur masse molaire qui augmente avec le nombre de cycle benzénique. Les différentes caractéristiques physico-chimiques des HAP déterminent pleinement leurs comportements dans l'environnement. En effet, les HAP de faible poids moléculaire, possédant de 2 à 3 cycles benzéniques, ont une solubilité et une volatilité plus élevées. Ils peuvent donc se retrouver partiellement dans la phase gazeuse (atmosphère) et aqueuse de l'environnement. Ces propriétés les rendent plus vulnérables vis-à-vis des processus de dégradation puisqu'ils se retrouvent plus disponibles (Lundstedt, 2003). L'hydrophobicité augmente avec le nombre de cycles alors que la volatilité diminue. Les HAP de 4 à 6 cycles possèdent des masses molaires élevées, ils présentent la sorption la plus forte et de ce fait sont plus persistants dans le milieu. La forte hydrophobicité des HAP et leur faible pression de vapeur (excepté pour les HAP légers) les rendent peu mobiles, et fortement présents dans la phase solide de l'environnement. Effectivement, ils ont une capacité de sorption sur les constituants solides élevée et peuvent par conséquent être accumulés en quantités importantes dans l'environnement (Wilson and Jones, 1993). L'affinité des contaminants pour la phase solide peu ou très peu polaire par rapport à l'eau est reflétée par le coefficient de partage octanol-eau ( $K_{ow}$ ) qui est un indice de référence concernant la polarité des composés. Le  $K_{ow}$  des 16 HAP prioritaires est élevé ce qui explique la forte affinité pour la matière organique peu polaire et leur accumulation dans les sols en l'absence de dégradation (Chéfetz et al., 2000; Grant L Northcott and Jones, 2001). Ces différentes propriétés leur confèrent une forte toxicité, ils sont notamment connus pour être potentiellement cancérigènes et mutagènes (Chiapusio et al., 2007).

Tableau I-1. Propriétés physico-chimiques des 16 HAP listés comme prioritaires par l'US-EPA (Rapport INERIS, 2005)

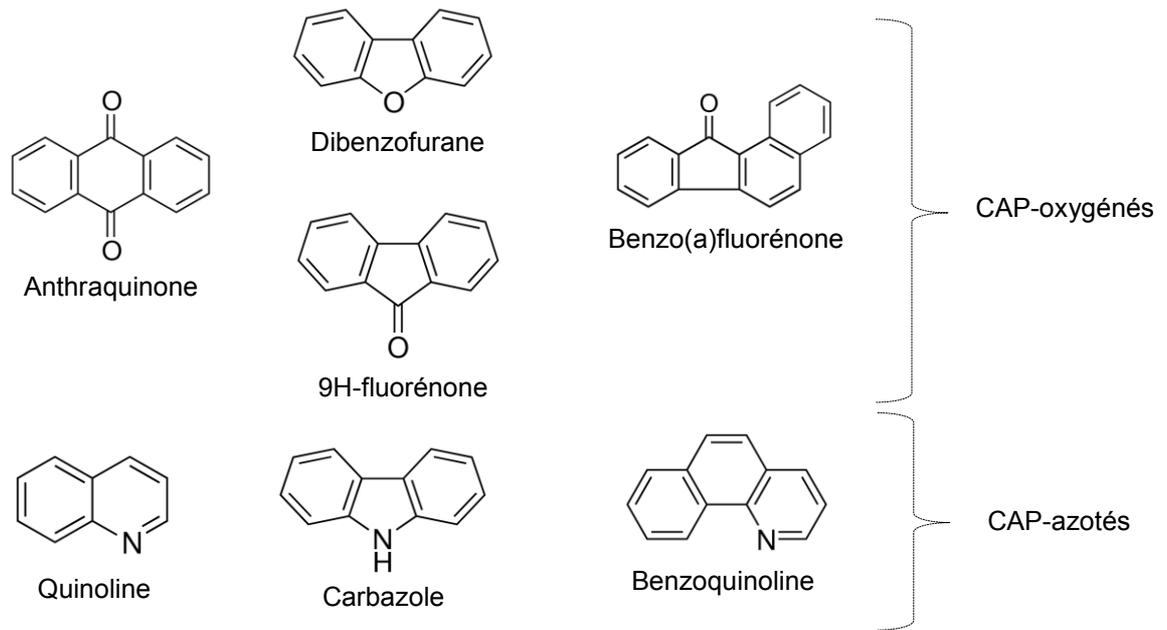
HAP	Nombre de cycle	Structure moléculaire	Masse molaire (g/mol)	Densité (g/cm <sup>3</sup> )	Solubilité dans l'eau (mg/L)	Coefficient de partage octanol-eau (log K <sub>ow</sub> )
Naphtalène	2		128,2	1,162	32	3,3
Acénaphtylène			152,2	1,194	3,93	4,07
Acénaphène			154,2	1,024	3,42	3,98
Fluorène	3		166,2	1,203	1,9	6,58
Phénanthrène			178,2	1,172	1	4,45
Anthracène			178,2	1,240	0,07	4,45
Fluoranthène			202,3	1,236	0,27	4,9
Pyrène			202,3	1,271	0,16	4,88
Benzo(a)anthracène	4		228,3	1,174	0,0057	5,61
Chrysène			228,3	1,274	0,06	5,16
Benzo(b)fluoranthène			252,3	-	0,001	6,04
Benzo(k)fluoranthène			252,3	-	0,0008	6,06
Benzo(a)pyrène	5		252,3	1,282	0,038	6,06
Dibenzo(ah)anthracène			278,3	1,252	0,0005	6,84
Benzo(ghi)pérylène			276,3	-	Insoluble	6,5
Indéno(1,2,3, cd)pyrène	6		276,3	-	0,0008	6,58

### 1.3. Polluants associés aux HAP dans un sol de friche industrielle

La pollution associée à la cokéfaction est le résultat d'un mélange complexe de molécules parmi lesquelles ne sont pas retrouvées uniquement les HAP mais d'autres composés organiques brièvement présentés dans ce paragraphe. Les polluants organiques identifiés dans les sols de cokerie sont plus ou moins complexes, et en proportions variables. La distillation du charbon produit du coke et induit également la formation de sous-produits tels que du goudron de houille et du gaz « de ville » (Duchêne et al., 1991). Le goudron de houille est essentiellement constitué de composés organiques aromatiques et représente une source majeure de pollution aux HAP (Luthy, 2004). Ceci explique que les sites où ont été implantés des usines telles que les cokeries se retrouvent fortement contaminés par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Haeseler et al., 1999). Dans ces sols, outre les diverses matières organiques regroupant le coke, le goudron de houille, et le charbon, des matériaux de construction sont également retrouvés.

#### 1.3.1. Les composés aromatiques polycycliques oxygénés et azotés

Malgré leur statut de polluants prioritaires, les HAP ne sont pas les seuls contaminants présents dans les sols pollués à présenter des risques pour l'environnement (Howsam and Jones, 1998b; Lundstedt, 2003). En effet, une autre classe de composés aromatiques polycycliques (CAP) peut contribuer de manière significative à la charge toxique des contaminants. C'est le cas des composés aromatiques polycycliques oxygénés (CAP-O) (Lundstedt et al., 2007) et azotés (CAP-N). Ils sont produits à partir des mêmes sources et possèdent des propriétés similaires à celles des HAP. Ils se différencient de ces derniers par un ou plusieurs atomes d'oxygène ou d'azote attaché(s) à la structure cyclique aromatique. La présence de groupement hydroxyle, carbonyle, amine ... rend ces composés plus polaires, et donc plus solubles que les HAP. Ils peuvent donc largement contribuer aux risques environnementaux inhérents aux sites et sols pollués par transfert dans les nappes souterraines par exemple, et commencent de ce fait à être intégrés dans le diagnostic des sols contaminés (Lundstedt et al., 2014). Ces composés peuvent aussi être synthétisés à la suite de la dégradation des HAP dans les sols (Cerniglia, 1993).



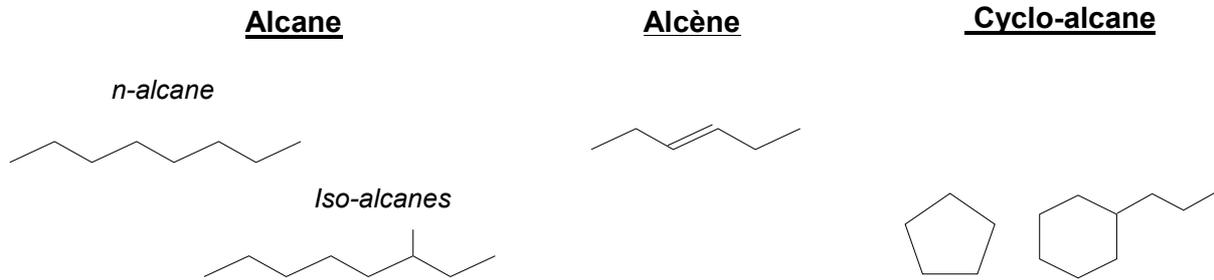
**Figure I-1.**Exemples de composés aromatiques polycycliques oxygénés (CAP-O) et azotés (CAP-N) retrouvés dans les sols pollués (Dagois, 2015)

### 1.3.2. Les autres composés organiques

**Les asphaltènes et résines.** Des composés polaires de haut poids moléculaire, comme les asphaltènes et les résines, peuvent aussi être retrouvés dans les sols de cokerie en proportion importante. Ce sont des composés polyaromatiques condensés pouvant être ramifiés par des chaînes alkyles formant la fraction lourde et polaire de la matière organique anthropique. Différents groupes fonctionnels peuvent être caractérisés dans ces molécules comme des cétones ( $=O$ ), aldéhydes ( $-CHO$ ), hydroxyles ( $-OH$ ), thiols ( $-SH$ ), amines ( $-NH_2$ ). Compte tenu de leurs caractéristiques physico-chimiques, ces composés peuvent être lixiviés et se retrouver dans les nappes phréatiques.

**Les hydrocarbures aliphatiques.** Ce sont des composés organiques très stables, chimiquement formés exclusivement de carbone et d'hydrogène. Ils présentent des liaisons de type C-C (non polarisées) et C-H (très peu polarisées) les rendant peu réactifs. Ils regroupent les alcanes, les alcènes, les iso-alcanes et les cyclo-alcanes. Les alcanes possèdent des atomes de carbone reliés entre eux par des liaisons simples, ils peuvent être acycliques linéaires (n-alcanes) ou ramifiés (iso-alcanes) ou cycliques (cyclo-alcanes) (**Figure I-2**). Les hydrocarbures peuvent également former des molécules insaturées composées de liaisons

doubles et/ou triples regroupant les alcènes, les alcynes. Ce sont des composés ubiquistes qui peuvent être produits par des processus biotiques ou abiotiques (Biache, 2010).

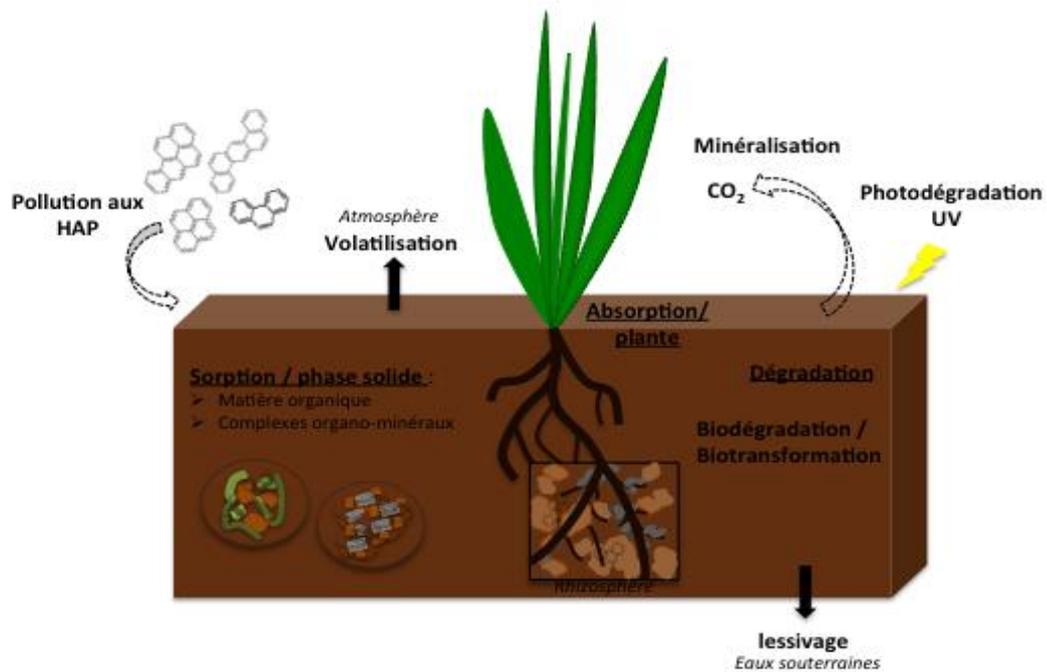


**Figure I-2.** Exemples d'hydrocarbures aliphatiques présents dans les sols de cokerie.

Les sites contaminés par des HAP et d'autres contaminants associés présentent des risques majeurs pour la santé humaine et pour les écosystèmes. En conséquence, des méthodes de remédiation ont été développées ces dernières décennies de façon à contenir ou à éliminer ces polluants toxiques, potentiellement cancérigènes et mutagènes (Usman et al., 2012). Les stratégies appliquées en remédiation pour restaurer les sites contaminés sont nombreuses, de natures variées et plus ou moins avantageuses. Elles sont présentées de manière non exhaustive dans le paragraphe 2.5. .

## 2. Devenir des HAP dans les sols

Le sol représente un des réservoirs majeurs pour les contaminants organiques dans l'environnement (Semple et al., 2003). Ils peuvent se distribuer entre les 3 phases liquide, solide et gazeuse constituant le sol (Barriuso, et al., 1996.). Le devenir des contaminants organiques dans les sols est gouverné par différents facteurs incluant les caractéristiques du milieu, les propriétés intrinsèques des polluants et les conditions environnementales (Gevao et al., 2000). Compte tenu de leur caractère hydrophobe, ils se retrouvent principalement dans la phase solide. En revanche, lorsqu'ils sont dégradés ils vont pouvoir se retrouver davantage dans la phase liquide et gazeuse.



**Figure I-3.** Schéma des principaux processus régissant le devenir des HAP dans les sols.

Les HAP peuvent être soumis à différents mécanismes déterminant leur comportement dans les sols (Smith et al., 2011). Il existe des processus biotiques impliquant les organismes vivants (biodégradation et transfert) et abiotiques (lessivage, volatilisation, sorption aux particules de sol) (Jones, 1993) (**Figure I-3**).

### 2.1. Volatilisation, lessivage et photodégradation

Les processus de volatilisation, lessivage et photodégradation sont considérés comme étant minoritaires dans les sols.

☞ La volatilisation va dépendre de la pression de vapeur de la molécule, plus elle est élevée et plus le composé aura tendance à passer de la phase solide à la phase gazeuse. Les HAP, à l'exception des légers à 2 ou 3 cycles, possèdent une faible pression de vapeur et vont donc être très peu volatilisés.

☞ Le lessivage des HAP dans les sols va aussi dépendre des propriétés intrinsèques des molécules, et notamment de leur nature hydrophobe. La solubilité des HAP diminue

avec le nombre de cycles aromatiques (**Tableau I-1**). Le lessivage intervient aussi faiblement dans la dissipation des HAP.

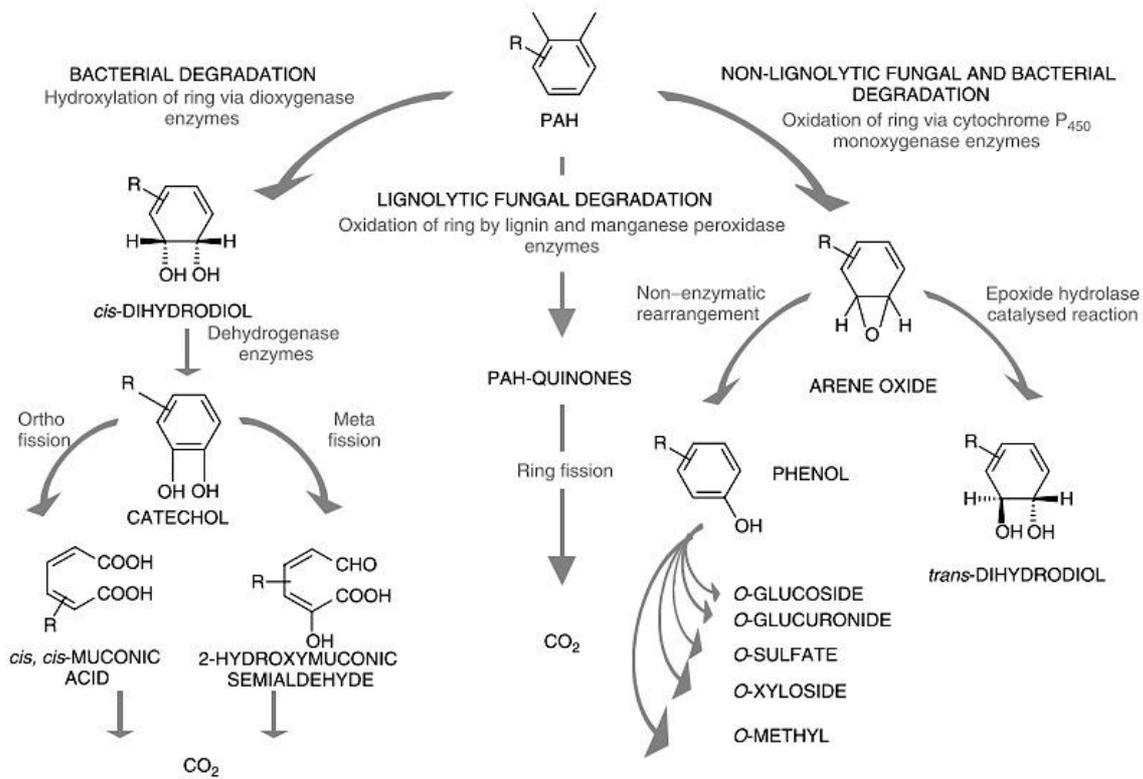
 Les HAP peuvent aussi être dégradés chimiquement sous l'action des rayons UV, cependant ce processus n'intervient qu'en surface, sur les premiers centimètres.

## 2.2. Biodégradation et biotransformation des HAP

Les différentes classes de microorganismes impliqués dans les processus de dégradation des HAP dans les sols contaminés sont les algues, les champignons et les bactéries. Toutefois, ce sont les bactéries qui sont les plus actives pour métaboliser les HAP (Haritash and Kaushik, 2009). Les microorganismes et les différentes voies de biosynthèse impliquées dans la biodégradation des HAP dans les sols ont été intensivement étudiées ces dernières décennies (Atlas, 1981; Haritash and Kaushik, 2009; Kanaly and Harayama, 2000; Shuttleworth and Cerniglia, 1995; Zhang et al., 2006). Une partie de la microflore indigène du sol, en particulier s'il est contaminé, est adaptée à la pollution et potentiellement capable d'utiliser le carbone issu du contaminant comme source de carbone et/ou d'énergie pour croître dans le milieu. La biodégradation des HAP dépend cependant d'un nombre important de facteurs : des conditions environnementales, des propriétés intrinsèques du milieu (ex. pH, humidité) mais aussi de la disponibilité du polluant et du potentiel de dégradation des microorganismes indigènes (algues, champignons & bactéries) (Okere and Semple, 2012).

### 2.2.1. Voies métaboliques de dégradation des HAP par les microorganismes

Les deux voies métaboliques microbiennes qui peuvent intervenir dans la dégradation des HAP sont les voies aérobies et anaérobies (Cerniglia, 1993). En conditions aérobies, les bactéries et champignons utilisent des voies cataboliques distinctes (**Figure I-4**) qui vont donner des produits de dégradation variés. Contrairement aux champignons qui métabolisent les HAP en composés plus solubles, les bactéries utilisent généralement les HAP comme source d'énergie et de carbone.



**Figure I-4.** Les 3 principales voies métaboliques pour l'oxydation des HAP par les bactéries et champignons (Bamforth and Singleton, 2005)

Les enzymes qui interviennent généralement dans la biodégradation des HAP sont des monooxygénases (champignons) ou des dioxygénases (bactéries) (Kelley et al., 1993; Moody et al., 2004, 2001) qui permettent l'oxydation des cycles aromatiques de la molécule organique (Jones, 1993).

➤ Voies de dégradation des HAP par les bactéries

Dès leur entrée dans la voie de dégradation bactérienne, les molécules subissent une première hydroxylation (Cerniglia, 1993) catalysée par une enzyme de type dioxygénase. Ainsi, l'oxygène (accepteur d'électron) réagit avec deux carbones adjacents pour former du *cis*-dihydrodiol (Zhang et al., 2006). La molécule est ensuite simplifiée progressivement par une succession de réactions chimiques (oxydo-réductions) jusqu'à la minéralisation complète du carbone sous forme de CO<sub>2</sub>, d'H<sub>2</sub>O et d'énergie (Neilson and Allard, 2008). Le carbone est soit minéralisé, soit utilisé par la bactérie et incorporé dans sa biomasse (Kästner et al.,

1999a). En effet, la biodégradation n'est pas nécessairement complète et peut former des composés de faible poids moléculaire participant à la biosynthèse de cellules microbiennes.

De nombreuses espèces bactériennes capables de métaboliser les HAP ont été identifiées, les genres couramment retrouvés sont *Pseudomonas*, *Rhodococcus* ou *Mycobacterium sp.* Suivant les caractéristiques physico-chimiques de la molécule, les voies métaboliques sont différentes. Cependant, les voies biochimiques peuvent être communes pour les HAP de bas poids moléculaire comme c'est le cas pour le naphthalène (Resnick et al., 1996), le phénanthrène (Menn et al., 1993; Pinyakong et al., 2003), l'anthracène et l'acénaphthène (Dean-ross et al., 2001; Pinyakong, 2004). Les premiers composés produits par la voie aérobie dans la biodégradation des HAP sont des dihydroxyles qui vont ensuite former des protocatéchuates, des catéchols, puis des intermédiaires tricarboxyliques (Peng et al., 2008). Les principaux produits de dégradation des HAP sont des alcools, acides carboxyliques, composés dihydrodiols, des phénols, des quinones (Wilson and Jones, 1993).

#### ➤ Voies métaboliques de dégradation des HAP par les champignons

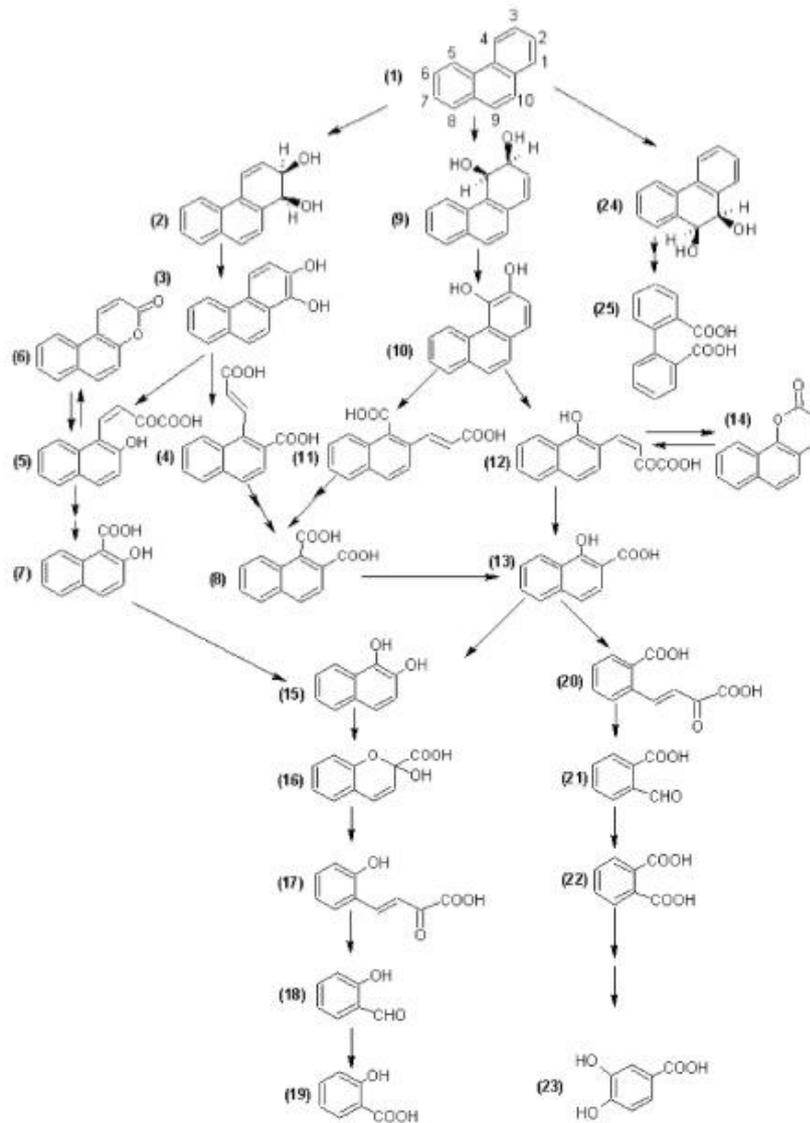
Deux groupes distincts de champignons sont capables de dégrader les HAP : les champignons lignolytiques et non lignolytiques (Bamforth and Singleton, 2005; Cerniglia, 1997). Les champignons peuvent employer deux mécanismes différents pour dégrader les HAP, certains utilisent les enzymes du cytochromes P450 pour catalyser l'insertion de l'oxygène dans le noyau de la molécule. D'autres, c'est la particularité des champignons lignolytiques, synthétisent des enzymes extracellulaires (laccase et peroxydase) non-spécifiques qui peuvent dégrader la lignine (mélange de molécules variées et complexes) (Peng et al., 2008). Les champignons de la pourriture blanche, ubiquitaires dans l'environnement (Speranza et al., 2005), sont parmi les champignons lignolytiques les plus étudiés pour leur potentiel de métabolisation des HAP.

### 2.2.2. Voies de dégradation du PHE par les bactéries et les champignons

Le phénanthrène est un hydrocarbure aromatique polycyclique à 3 cycles (**Tableau I-1**) habituellement retrouvé avec des teneurs élevées dans les sols pollués. Il peut être soumis à diverses voies de dégradation suivant l'organisme.

➤ Exemple de voie de dégradation du PHE par les bactéries

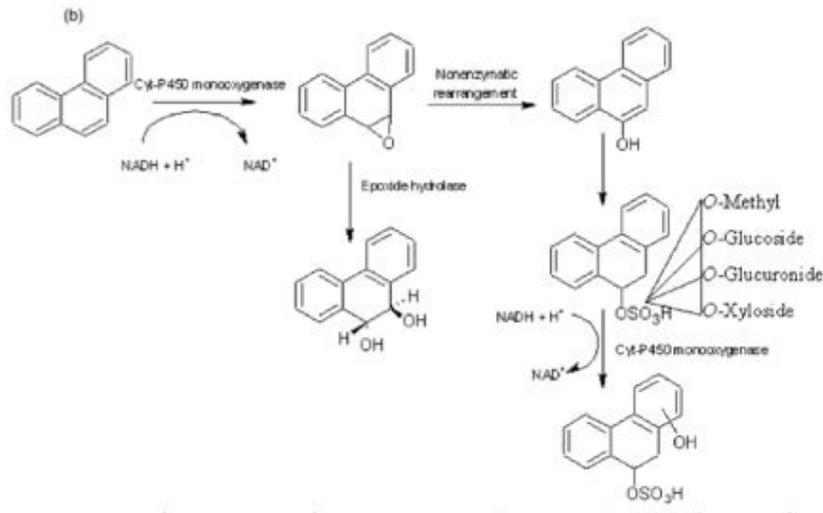
Un exemple de voies métaboliques permettant de cataboliser le phénanthrène par une bactérie aérobie est donné dans la **Figure I-5**, et de produire un nombre varié de métabolites. Par exemple, l'intermédiaire acide 1-hydroxy-2-naphtoïque qui peut soit être métabolisé en acide salicylique, soit en acide protocatéchuïque. Ces deux intermédiaires métaboliques ne sont pas obligatoirement des produits finaux mais peuvent être utilisés comme source de C par certaines bactéries lors de la croissance cellulaire et ainsi se retrouver incorporés dans la biomasse.



**Figure I-5.** Voies biochimiques de dégradation du phénanthrène par une bactérie aérobie produisant les métabolites suivants : (1), *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrophenanthrene (2), 1,2-dihydroxyphenanthrene (3), 2-[(*E*)-2-carboxyvinyl]-1-naphthoic acid (4), *trans*-4-(2-hydroxynaph-1-yl)-2-oxobut-3-enoic acid (5), 5,6-benzocoumarin (6), 2-hydroxy-1-naphthoic acid (7), naphthalene-1,2-dicarboxylic acid (8), *cis*-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrophenanthrene (9), 3,4-dihydroxyphenanthrene (10), 1-[(*E*)-2-carboxyvinyl]-2-naphthoic acid (11), *trans*-4-(1-hydroxynaph-2-yl)-2-oxobut-3-enoic acid (12), 1-hydroxy-2-naphthoic acid (13), 7,8-benzocoumarin (14), 1,2-dihydroxynaphthalene (15), 2-hydroxy-2H-chromene-2-carboxylic acid (16), *trans*-o-hydroxybenzalpyruvic acid (17), salicylaldehyde (18), salicylic acid (19), *trans*-2-carboxybenzalpyruvic acid (20), 2-carboxybenzaldehyde (21), *o*-phthalic acid (22), protocatechuic acid (23), *cis*-9,10-dihydroxy-1,2-dihydrophenanthrene (24), and 2,2-diphenic acid.

➤ Exemple de voie de dégradation du PHE par les champignons

La **Figure I-6** donne un exemple de voie métabolique utilisée par les enzymes monooxygénases P450 synthétisées par les champignons.



**Figure I-6.** Voie métabolique de dégradation du phénanthrène proposée pour les champignons utilisant les monooxygénases P450.

Les métabolites intermédiaires formés par les voies microbiennes de dégradation des HAP peuvent s'avérer plus toxiques, cancérigènes et mutagènes que leurs composés parents (Xiao et al., 2012).

### 2.2.3. Produits de dégradation et de transformation des HAP

Les processus de dégradation peuvent conduire à la minéralisation totale des HAP en produisant  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  et autres composés inorganiques. Mais comme nous venons de le voir, la dégradation des HAP peut conduire à la production d'une variété de métabolites incluant des intermédiaires temporaires ou des composés résistants à la dégradation qui peuvent donc potentiellement s'accumuler dans la matrice.

Certains composés aromatiques polycycliques (§1.3.1) polaires, les dérivés oxygénés des HAP par exemple, peuvent être identifiés comme des produits de dégradation (Biache et al., 2011; Lundstedt et al., 2006). Ils sont plus solubles que leur composé parent et ils peuvent être davantage lessivés du sol (Lundstedt et al., 2007; Schlanges et al., 2008). Compte tenu des leurs propriétés physico-chimiques et de leur potentiel toxicité, ils présentent un intérêt

croissant, (Bandowe et al., 2010; Biache et al., 2011) ont analysé des CAP oxygénés et nitrés à partir de sols variés (urbain, forestier et industriel).

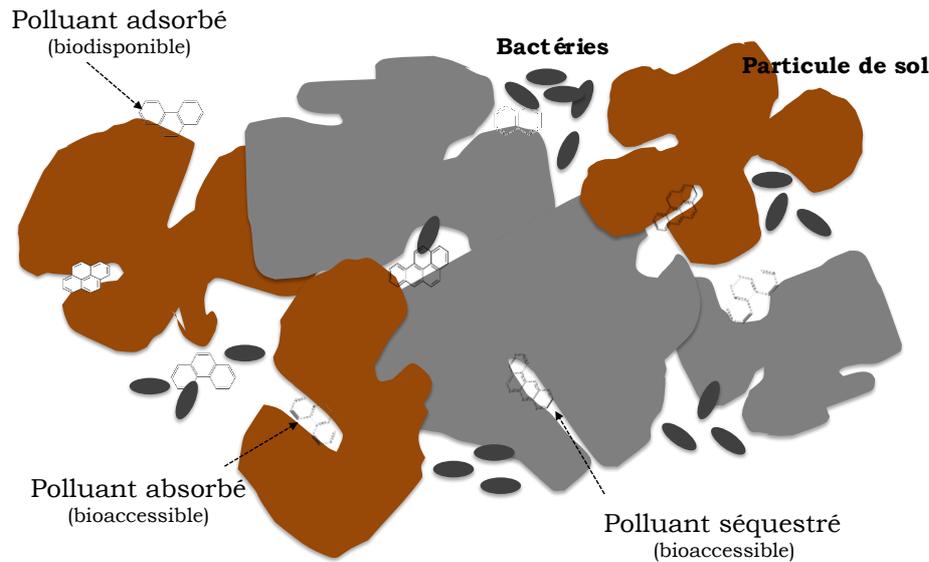
Parmi les produits retrouvés au cours de la dégradation des HAP, les composés hydroxylés et carboxylés sont les plus polaires et les plus difficiles à analyser. De plus, ils sont souvent présents en faible concentration par rapport aux HAP parents, et plus difficiles à identifier en mélange complexe (Lundstedt, 2003). D'où l'importance d'utiliser des techniques analytiques efficaces pour les extraire, les séparer et enfin les identifier (§3.1.1).

La biodégradation est un des mécanismes prédominant dans la dissipation des HAP cependant le devenir des polluants organiques est aussi significativement influencé par les diverses interactions qu'ils créent avec les constituants du sol (Ni et al., 2008). Les HAP étant fortement hydrophobes ils ont tendance à s'associer majoritairement à la phase solide du sol via des processus de sorption.

### 2.3. Interactions des HAP avec les constituants du sol

Le sol est un système complexe à l'échelle de l'écosystème mais également à l'échelle des agrégats où les interactions entre matière organique (MO), microorganismes et minéraux sont supposées contrôler le devenir à long terme du carbone, des nutriments, et des polluants présents dans le sol (Lehmann et al., 2007; Schmidt et al., 2012).

Les contaminants organiques hydrophobes peuvent être sorbés sur les surfaces externes des particules de sol mais aussi sur les surfaces internes des agrégats et diffuser dans les micropores du sol où ils sont séquestrés (Ahn et al., 2005; Bogan and Sullivan, 2003; Hatzinger and Alexander, 1995) (**Figure I-7**).



**Figure I-7.** Schéma illustrant les différents mécanismes de sorption des HAP par les particules de sol adapté de Okere and Semple (2012).

L'adsorption n'est pas considérée comme un événement complètement réversible, en effet, il est possible d'observer une différence entre la quantité de polluants adsorbée et désorbée. Ce phénomène est défini par le terme d'**hystérèse** (Pignatello and Xing, 1996)

### 2.3.1. Rôle de la matière organique dans la sorption des HAP

Les constituants organiques et inorganiques (e.g. argiles, oxydes métalliques) contribuent grandement à la sorption des HAP (Hwang et al., 2002). Néanmoins, la matière organique est le facteur affectant le plus fortement les processus de sorption par sa quantité, sa qualité et par sa nature chimique (Ahangar, 2010). Elle influence fortement le comportement des contaminants organiques dans la matrice, leur biodisponibilité et leur mouvement dans l'environnement (Celis et al., 2006). La structure chimique de la MO dépend de son origine. Dans un sol de friche industrielle, elle peut être d'origine naturelle mais aussi provenir de sources anthropiques. Les matières organiques anthropogéniques sont généralement majoritaires dans ce type de sols.

**La matière organique naturelle.** La matière organique naturelle est formée par un ensemble de composés organiques hétérogènes (morts ou vivants) d'origines végétales, animales ou microbiennes. On distingue les matières organiques fraîches (MOF), constituées par les débris

végétaux, animaux et microbiens (souterrains ou aériens) à différents stades de décomposition (Gobat et al., 2010). Les matières organiques humifiées sont obtenues par des processus d'humification et de minéralisation de la MOF (Duchaufour, 1984; Gobat et al., 2010). L'humification donne lieu à la recombinaison ou à la polymérisation de composés organiques plus ou moins complexes et produits des composés stables (Calvet, 2003) qui le sont davantage lorsqu'ils s'associent aux minéraux.

**La matière organique anthropogénique.** Elle est formée par fossilisation de la MO naturelle (au cours de phénomènes géologiques) ou à la suite d'activités de combustion de matières fossiles inhérentes à l'Homme par exemple (§1.3) Les MO anthropogéniques possèdent des caractéristiques spécifiques qui diffèrent des matières organiques naturelles (Crampon, 2015). Les particules émises dans l'environnement à la suite de processus industriels présentent généralement une structure aromatique tridimensionnelle et possèdent une microporosité et des surfaces spécifiques élevées. Ces propriétés font de ces composés anthropiques, des sorbants influents dans le comportement des HAP dans les sols industriels (Kwon and Pignatello, 2005).

La diversité des composés caractérisant la MO du sol peut engendrer des interactions variées et complexes avec les contaminants organiques hydrophobes. De nombreuses études se sont focalisées sur l'influence de la nature de la MO du sol sur la sorption de contaminants organiques, tels que les HAP (Conte et al., 2001; B Pan et al., 2006; Yang et al., 2010). Par exemple, Chen et al. (2007) et Xing (2001) ont établi une corrélation entre la sorption des composés hydrophobes et l'aromaticité des acides humiques. Au contraire, Chefetz and Xing, (2009) et Salloum et al. (2002) ont révélé une forte affinité des domaines aliphatiques de la MO du sol pour les HAP. Une différence de sorption entre les différents composés de la MO du sol comme les acides fulviques, humiques et l'humine a été observée par Garbarinit and Llon (1986). En effet, les acides fulviques sont les composés les plus polaires, et donc les plus réactifs des composés humiques dans les sols. Toujours est-il que Doick et al. (2005) ont montré que plus de 60% des HAP étaient retrouvés associés à l'humine. Les substances humiques possèdent de larges surfaces externes avec lesquelles peuvent réagir des substances chimiques par adsorption ou plus fermement par séquestration dans les espaces internes (Schnitzer and Khan, 1978).

La capacité de sorption des contaminants hydrophobes a donc été abondamment étudiée en présence de MO du sol de nature aromatique (Chiou et al., 1998; Perminova, 1999) et/ou aliphatique (Chefetz and Xing, 2009; Salloum et al., 2002). Simpson et al. (2003) ont cependant rapporté que l'aromaticité n'était pas suffisante pour évaluer le degré de sorption des HAP aux acides humiques. Les caractéristiques de la MO du sol ne peuvent pas être utilisées seules pour déterminer ou prédire le comportement de sorption des HAP. Aussi, les interactions entre le sol et les composés organiques ne sont pas influencées uniquement par la nature (Piatt and Brusseau, 1998) mais aussi la quantité (Hatzinger and Alexander, 1995) de la MO. Dans l'étude de Celis et al. (2006), une faible corrélation a été retrouvée entre les coefficients de sorption du PHE et la quantité de carbone organique des sols, ceci indique que la sorption ne peut pas être prédite exclusivement à partir de la concentration en carbone organique des échantillons (Pusino et al., 1992).

La plupart des travaux ont pour objectif d'améliorer la compréhension des mécanismes de rétention des MO du sol en fonction de leur nature. En revanche, les études sont généralement réalisées à partir d'extrait de matières organiques naturelles tels que les acides fulviques, humiques et l'humine des sols. Or, ce n'est pas la matière organique naturelle qui domine dans les sols de friches industrielles. Les composés organiques caractérisant la matière anthropique peuvent avoir une affinité beaucoup plus élevée pour les HAP que la matière organique naturelle (Grathwohl, 1990; Weber et al., 1992). Le « black carbon » (BC) fraction récalcitrante, issu de la combustion incomplète de biomasse et de MO fossile, regroupe un mélange de particules carbonées tels que la suie, le charbon, le coke (Cornelissen et al., 2005; Schmidt and Noack, 2000). Ce résidu carboné fait partie des composés organiques ayant une sorption importante vis-à-vis des contaminants hydrophobes (Agarwal and Bucheli, 2011). En effet, Li et al. (2010) par exemple ont suggéré que le black carbon pouvait être un adsorbant prédominant des HAP dans le sol. De plus, l'affinité très forte des HAP vis-à-vis de cette matrice peut induire une diminution de leur disponibilité dans les sols (Mechlińska et al., 2009). Les matières carbonées formant le black carbon sont connues pour avoir des structures condensées et une forte microporosité permettant aux contaminants, à long terme, de diffuser dans les micropores les rendant inaccessibles pour la biodégradation. Aussi, Cornelissen et al. (2006) suggèrent que la présence de black carbon, de kérogène et de charbon peut causer une forte de sorption des HAP. Néanmoins, la matière organique naturelle présente dans ce type de sol (même si elle ne représente généralement qu'une faible

proportion) peut s'associer au black carbon et atténuer les propriétés de surface de ce dernier (Kwon and Pignatello, 2005).

Malgré l'importance du compartiment organique dans le devenir des HAP dans les sols, les constituants inorganiques du sol (Ball and Roberts, 1991; Mader et al., 1997) peuvent influencer significativement le comportement des contaminants organiques dans les sols. Par exemple en jouant un rôle notoire dans la conformation de la MO du sol, d'où l'importance de considérer aussi les associations organo-minérales.

### 2.3.2. Réactivité des minéraux et adsorption des HAP

La réactivité des composés présents dans le sol est liée à leur surface spécifique. Pour les particules minérales, la surface spécifique varie grandement puisqu'elle est comprise entre 7 et 30 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> pour la kaolinite et peut atteindre 800 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> pour les smectites (**Tableau I-2**). En effet, la plupart des minéraux argileux possèdent de grandes surfaces spécifiques (Piwoni and Keeley, 1990), et donc de grandes surfaces disponibles pour la sorption d'ions ou de molécules. Les oxydes et hydroxydes ont une surface spécifique intermédiaire comprise entre 100 et 800 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> de sol (**Tableau I-2**). L'attraction des contaminants organiques hydrophobes sur les surfaces polaires des constituants du sol est associée à la surface spécifique des sorbants (Müller et al., 2007). Généralement, ce sont les minéraux argileux qui ont la capacité de sorption la plus élevée du fait de leur grande surface spécifique (Curtis et al., 1986; Stauffer and Macintyre, 1986). C'est aussi le cas pour certains oxyhydroxydes de fer comme la ferrihydrite et la goethite. Cependant, l'affinité de sorption des minéraux peut varier en fonction de la nature des contaminants. Ainsi, plusieurs études ont montré une plus grande affinité des oxydes de fer pour des contaminants organiques hydrophobes contenant des structures aromatiques par rapport à d'autres phases minérales comme des oxydes d'aluminium ou de silicates (Huang and Weber, 1998; Mader et al., 1997; Stauffer and Macintyre, 1986). Les smectites possédant de larges surfaces spécifiques pourraient fortement influencer le devenir et le transport des contaminants organiques hydrophobes dans l'environnement (Hundal et al., 2001). Les minéraux pourvus d'une surface spécifique élevée ont des propriétés d'adsorption pouvant se révéler très efficaces dans la rétention de nombreux polluants organiques et inorganiques (Schulze, 2006).

Tableau I-2. Caractéristiques des principaux minéraux du sol (Bailey and White, 1964)

<b>Famille</b>	<b>Minéral</b>	<b>Formule chimique</b>	<b>Surface spécifique (m<sup>2</sup>/g)</b>
<b>Phyllosilicates</b>	<b>Kaolinite</b>	$Al_2Si_2O_5(OH)_4$	<b>7 à 30</b>
	<b>Illite</b>	$(K,H_3O)(Al,Mg,Fe)_2(Si,Al)_4O_{10}(OH)_2$	<b>65 à 100</b>
	<b>Montmorillonite</b>	$(Na,Ca)_{0,3}(Al, Mg)_2Si_4O_{10}(OH)_2 \cdot nH_2O$	<b>600 à 800</b>
	<b>Vermiculite</b>	$(Mg,Fe,Al)_3(AlSi_3O_{10})(OH)_4 \cdot 4H_2O$	<b>600 à 800</b>
	<b>Chlorites</b>	$(Fe,Mg,Al)_6(Si,Al)_4O_{10}(OH)_8$	<b>25 à 40</b>
<b>Oxydes et hydroxydes de fer</b>	<b>Goethite</b>	$FeO(OH)$	<b>100 et 800</b>
	<b>Hématite</b>	$Fe_2O_3$	
	<b>Magnétite</b>	$Fe_3O_4$	

Les minéraux qui interviennent dans la sorption des HAP possèdent des sites de surfaces réactifs tels que des groupements hydroxyles (-OH) ou siloxanes (O-Si-O). Kögel-Knabner et al. (2008) indiquent le type de surfaces minérales susceptibles d'interagir avec la MO, ainsi sont discernées les surfaces : (i) pourvues de groupements hydroxyles communs aux oxydes/hydroxydes métalliques, (ii) siloxanes chargées en permanence, retrouvées par exemple chez les phyllosilicates de type 1:2 comme l'illite, la vermiculite et la smectite et (iii) siloxanes sans charges de surfaces comme celles qui peuvent être identifiées sur les minéraux de type 1:1 telle que la kaolinite. Cependant, Kahle et al. (2004) ont mis en évidence des interactions plus faibles avec les groupements hydroxyles des oxydes de fer comparées à celles se produisant avec les surfaces siloxanes des minéraux argileux. Les travaux de Gaboriau and Saada (2001) suggèrent que les argiles sont parmi les phases minérales qui possèdent les surfaces les plus réactives, et qui influencent significativement l'adsorption des molécules organiques. Le rôle majeur de la fraction minérale dans la rétention des composés organiques est d'autant plus visible sous certaines conditions, comme par exemple lorsque les teneurs en MO sont faibles (Pan et al., 2006).

Plusieurs auteurs se sont intéressés à la sorption des HAP sur les minéraux. Biache et al. (2015) ont rapporté que les HAP étaient fortement retenus sur les surfaces de la bentonite à la différence du sable de silice. Les propriétés de sorption de la bentonite seraient de ce fait plus importantes à l'égard des HAP. Müller et al. (2007) ont laissé supposer que les surfaces minérales étaient capables de sorber des quantités considérables de HAP en l'absence de MO,

comme l'ont suggéré d'autres auteurs (Curtis et al., 1986; Mader et al., 1997; Piatt et al., 1996). La sorption serait principalement contrôlée par la nature des phases minérales exerçant une influence croissante lorsque les quantités de carbone diminuent.

Dans leurs travaux, Wang and Xing (2005) ont indiqué que les acides humiques sorbés sur les surfaces de la kaolinite sont plus aliphatiques et donc plus hydrophobes. En conséquence, ils faciliteraient la sorption des HAP en comparaison des MO sorbées sur les surfaces de la montmorillonite par exemple. Celis et al. (2006) ont montré que les deux principaux facteurs influençant les propriétés de sorption de la MO du sol à l'égard des contaminants organiques hydrophobes étaient : (i) l'hétérogénéité de la MO et (ii) l'obstruction des domaines de sorption empêchant l'accès aux composés, causée par les interactions organo-minérales. La MO liée aux minéraux serait donc moins accessible pour l'incorporation des contaminants organiques hydrophobes que la MO libre (Jones and Tiller, 1999; Müller et al., 2007; Pusino et al., 1992). D'où l'importance de prendre en considération les associations organo-minérales dans l'étude de la dynamique des HAP dans les sols.

### **2.3.3. Influence des associations organo-minérales sur la dynamique des HAP**

L'importance des phases organiques et minérales a été soulignée dans de nombreuses études sur la dynamique des HAP dans les sols. La façon dont s'associent les composés organiques et minéraux influence considérablement le comportement des HAP. L'agencement et la taille des particules organo-minérales conditionnent la structure du sol, paramètre qui peut jouer un rôle significatif dans la distribution des contaminants organiques (Kukkonen and Landrum, 1996). La prise en compte des associations organo-minérales est de ce fait indispensable pour appréhender véritablement le devenir des contaminants dans la matrice solide du sol.

La sorption des matières organiques du sol aux argiles et aux oxydes est un des mécanismes essentiels pour la préservation à long terme du carbone organique des sols notamment (Lehmann et al., 2007; Lützow et al., 2006). L'étude des interactions ayant lieu au niveau des microenvironnements dans les sols est nécessaire pour comprendre le devenir du carbone, des éléments nutritifs mais aussi pour apprécier la dynamique des polluants dans le système.

Trois mécanismes de protection de la MO contre la dégradation ont été identifiés (Sollins et al., 1996) :

- La **récalcitrance chimique** due à la nature de la molécule. Certaines biomolécules de la MO du sol possèdent des caractéristiques structurales et chimiques les rendant difficilement dégradables par les microorganismes (Lützow et al., 2006). Certains scientifiques considèrent que ce processus assure une protection du carbone à long terme (Krull et al., 2006), alors que d'autres qu'il influence la stabilisation des MO du sol à court ou moyen terme uniquement (Schöning and Kögel-Knabner, 2006).
- La faible accessibilité de la MO pour les organismes dégradeurs, liée à la **protection physique des biomolécules**. Plusieurs mécanismes de protection peuvent avoir lieu, ainsi les molécules organiques peuvent être protégées (i) dans les micropores du sol, (ii) par intercalation entre les feuillets argileux, (iii) par hydrophobicité (Baldock and Skjemstad, 2000; Balesdent et al., 2000).
- Les interactions produites avec les minéraux induisent des processus **de protection et de stabilisation physico-chimique** (Lützow et al., 2006). Les interactions ayant lieu entre la MO et les phases minérales peuvent être variées, faibles (liaisons de Van der Waals, liaisons d'hydrogène) ou fortes (Oades, 1989; Vermeer et al., 1998; Vermeer and Koopal, 1998)

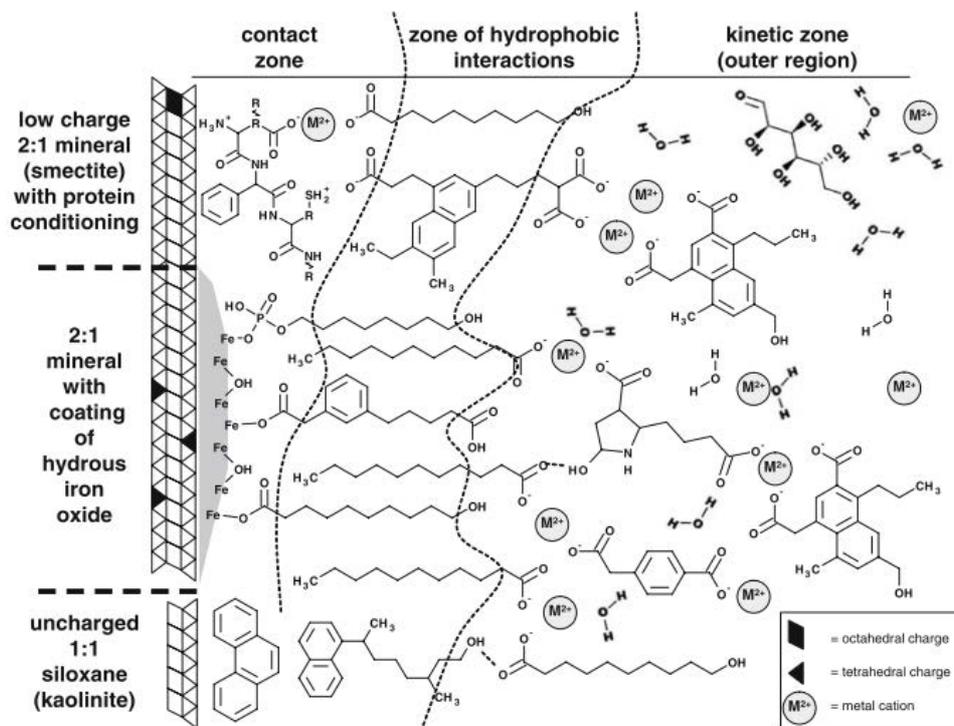


Figure I-8. Types d'interactions possibles entre les MO et les minéraux selon le modèle proposé par Kleber et al. 2007.

En effet, les interactions entre les MO et les phases minérales peuvent être formées par différents types de liaisons (**Figure I-8**) :

- ◆ Des liaisons fortes (covalentes ou ioniques) qui peuvent avoir lieu entre un groupe hydroxyle présent à la surface d'un oxyde de fer ou d'un phyllosilicate avec un groupe carboxyle (-COOH) ou hydroxyle (-OH) d'un phénol par exemple.
- ◆ Des liaisons de faible énergie regroupant : (i) les liaisons hydrogène formées entre un composé organique et une surface minérale non-chargée ou apolaire, (ii) les liaisons hydrophobes entre un groupement -OH, -COOH, -COH d'une molécule organique et un atome d'oxygène présent à la surface d'un minéral et (iii) les liaisons électrostatiques de Van der Waals, interactions avec un composé organique non chargé et une surface siloxane (Si-O-Si).

Le modèle de Kleber (**Figure I-8**) met en évidence la diversité de minéraux et la variété des interactions qui peuvent donc avoir lieu entre la MO et les minéraux, et notamment entre un polluant organique type HAP et un minéral argileux comme la kaolinite par exemple au moyen d'une surface hydrophobe de siloxane. Sur cette figure sont aussi représentés une smectite et un oxyde de fer hydroxylé donnant d'autres sortes d'interactions. Cette mosaïque fait apparaître 3 zones distinctes qui jouent un rôle important dans la dynamique des MO du sol : la zone de contact, la zone d'interactions hydrophobes et la zone cinétique.

Les interactions entre les polluants organiques et les constituants du sol peuvent être de nature variée. Elles vont dépendre des caractéristiques de la matrice solide à travers ces constituants organiques et inorganiques, mais aussi des conditions physico-chimiques environnantes et des propriétés propres au contaminant. Les HAP formellement apolaires peuvent se distribuer entre les domaines hydrophobes des sites présents sur certains composants du sol comme les argiles par exemple (Hundal et al., 2001; Kang et al., 2010).

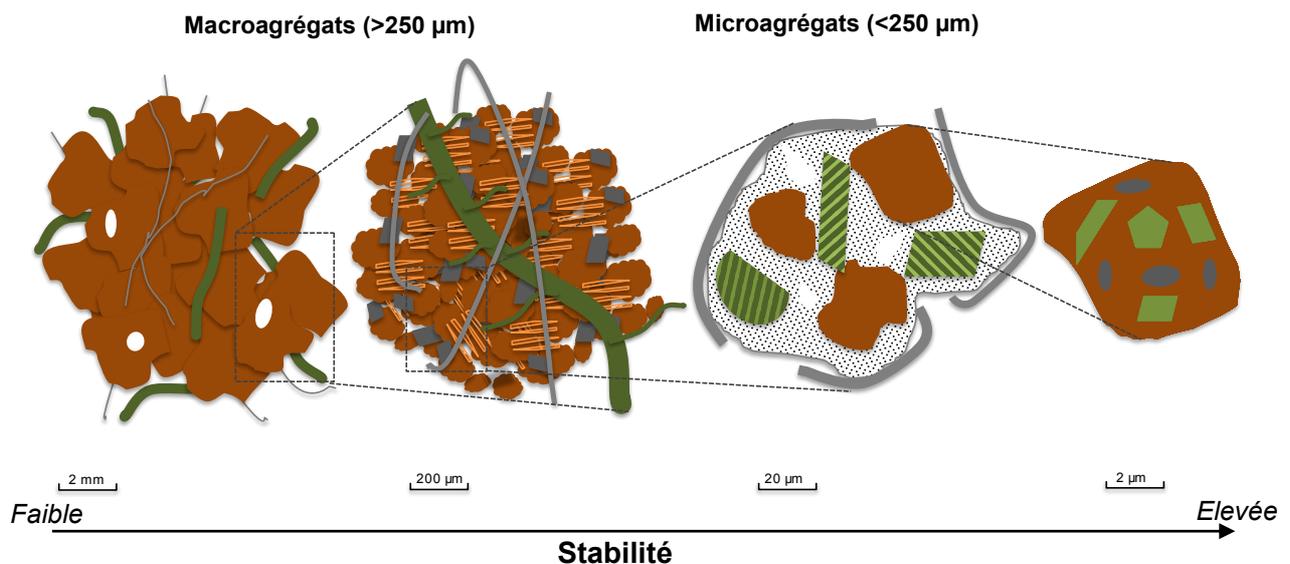
Pour des composés organiques hydrophobes, des interactions de type dipôle-dipôle induites entre le domaine de sorption chargé positivement et la liaison  $\pi$  du noyau aromatique peuvent aussi être envisagées (Mader et al., 1997). Dans des environnements où sont retrouvées de faibles quantités de carbone organique, ces interactions non covalentes cation -  $\pi$  apparaissent comme un mécanisme important dans la sorption et la rétention des HAP (Müller et al., 2007).

La structure tridimensionnelle de la MO du sol et l'accès aux différents domaines de sorption a une influence élevée sur le comportement des polluants organiques dans les sols.

Mais Bonin and Simpson (2007) suggèrent que les minéraux argileux influenceraient la conformation physique des MO du sol et la disponibilité des domaines de sorption. Les surfaces minérales n'interviendraient donc pas directement dans la sorption des HAP, mais par le biais des interactions créées avec la MO du sol. Elles gouvernent ainsi le comportement de sorption des acides humiques et fulviques par exemple (Feng et al., 2006) en bloquant les domaines de sorption ou en induisant des changements de conformation induisant une accessibilité augmentée ou diminuée pour les contaminants (Jones and Tiller, 1999; Laor et al., 1998; Pusino et al., 1992).

La matière organique liée aux minéraux a été définie comme toute la MO adsorbée sur les phases minérales ou piégée dans les microagrégats (Chenu and Plante, 2006; Wattelkoekkoek and Buurman, 2004).

Les agrégats de sol forment des assemblages hétérogènes de particules arbitrairement distinguées par leurs tailles (**Figure I-9**). Ils constituent des macroagrégats lorsque leur taille est supérieure à 250  $\mu\text{m}$  et des microagrégats lorsque leur diamètre est compris entre 250 et 2  $\mu\text{m}$  (Monrozier et al., 1991). Les macroagrégats sont arrangés à partir de l'association temporaire de microagrégats (Oades, 1984; Tisdall et al., 1982). La formation des macroagrégats est principalement due aux champignons mycéliums et à leur réseau d'hyphes qui permettent d'enfermer les particules de sol, et de les cimenter entre elles par la production d'exopolymères.



**Figure I-9.** Schéma présentant les 4 niveaux d'organisation des agrégats dans les sols d'après (Tisdall et al., 1982)

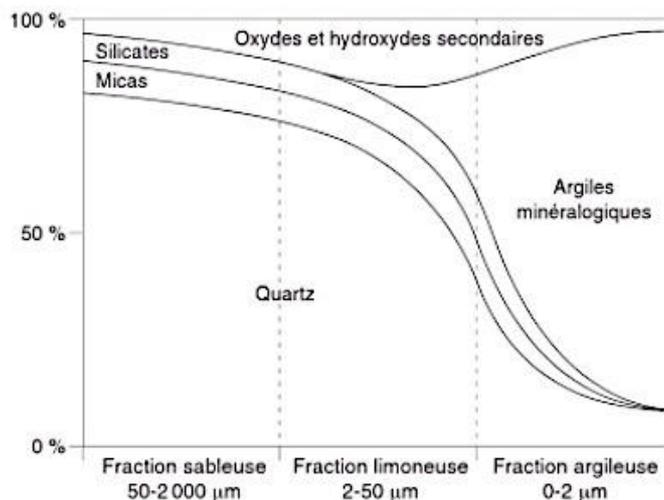
L'arrangement des constituants solides (organiques et minérales) détermine la structure du sol qui possède un rôle clé dans son fonctionnement (Bronick and Lal, 2005; Duchaufour and Masson, 1983), sa capacité à abriter des organismes vivants, dans la séquestration du carbone (Bronick and Lal, 2005) mais aussi dans la distribution des HAP (Amellal et al., 2001a; Pernot, 2013). Jusqu'à présent, les études se sont focalisées sur l'importance de l'agrégation en termes d'accessibilité des HAP (Amellal et al., 2001) en fonction de la taille des particules mais très peu sur la distribution des HAP en fonction de la densité des particules (Krauss and Wilcke, 2005) et donc de la nature des phases minérales sur leur dynamique. Effectivement, la sorption des HAP ne dépend pas uniquement de la taille des particules mais aussi de la nature des constituants du sol.

Les travaux de Amellal et al. (2001) et Pernot et al. (2013) ont mis en évidence l'influence des particules de différentes classes granulométriques sur la répartition des contaminants aromatiques dans un sol pollué qui se révèle non aléatoire, et que la fraction limoneuse semble jouer un rôle de protection vis-à-vis des HAP présents en quantité importante et faiblement disponibles. Les limons fins sont constitués, entre autres, d'argiles minéralogiques et d'oxyhydroxydes (**Figure I-10**) qui présentent des surfaces spécifiques élevées (**Tableau I-2**) qui peuvent interagir fortement avec la matière anthropique du sol et de ce fait jouer un rôle dans sa préservation. Doick et al. (2005) ont montré l'influence du type de MO sur la distribution des HAP au sein de fractions granulométriques, les HAP sont retrouvés principalement dans les fractions de tailles 2-20  $\mu\text{m}$  et  $<2 \mu\text{m}$  associés à l'humine alors qu'une faible fraction est liée aux fractions acides humiques et fulviques. Dans leur étude, ils ont aussi mis en avant l'importance du compartiment minéral du sol dans la distribution de deux HAP (fluoranthène et benzo[a]pyrene). En effet, les minéraux semblent jouer un rôle significatif dans la séquestration des contaminants organiques dans cette étude. Ils ont également suggéré que l'activité du  $^{14}\text{C}$ -HAP retrouvée, après traitement à l'eau oxygénée, est associée à des produits de dégradation des HAP chimiquement liés à la fraction minérale.

De nombreux auteurs ont essayé de mettre en évidence l'importance des propriétés du sol (texture et structure) dans la dynamique des HAP (dégradation, rétention et disponibilité) (Li et al., 2010; Lu et al., 2012; Uyttebroek et al., 2006). A la manière Amellal et al. (2001b) qui ont étudié la distribution et la localisation des HAP et des bactéries dégradantes à partir d'un sol de friche industrielle dans des fractions de classe granulométrique différentes. Ils ont montré un nombre important de bactéries dans les fractions limoneuse (2-20  $\mu\text{m}$ ) et argileuse ( $<2 \mu\text{m}$ ) et aussi une concentration élevée des HAP dans la fraction limoneuse. Ils ont mis en

exergue une corrélation étroite entre le nombre de bactéries et la concentration en HAP et donc l'influence de la nature et de la distribution des HAP dans la biodégradation. Les fractions de tailles granulométriques variées présentent des caractéristiques propres ce qui induit des capacités de sorption distinctes. En effet, la nature de la MO du sol varie d'une fraction granulométrique à l'autre. Dans un sol naturel, la MO qui domine dans la fraction sableuse provient des résidus de plante, et la MO retrouvée dans la fraction argileuse est dominée par des métabolites microbiens (Lützow et al., 2007). La composition de la MO associée aux différentes fractions de sol est variable (Christensen, 1992; Guggenberger et al., 1996; Kögel-Knabner et al., 2008), et notamment dans les sols industriels (Monserie et al., 2009). Par exemple, Kögel-Knabner et al. (2008) ont montré un appauvrissement des composés phénoliques à la surface des oxydes de fer. Aussi, Bonnard et al. (2012) ont montré, après caractérisation de la MO par  $^{13}\text{C}$ -RMN, que la fraction légère était enrichie en composés aliphatiques contrairement aux fractions denses enrichies en carbohydrates, indiquant une diminution des C-alkyles et aromatiques et une augmentation des O-alkyles (ex. polysaccharides) et des groupements carbonyles. Par conséquent, les fractions de sol sont caractérisées par des associations organo-minérales propres présentant des capacités de rétention variables vis-à-vis des polluants organiques.

La fraction fine serait la plus protectrice (Lorenzi et al., 2010; Pernot et al., 2013) avec des concentrations fortes en HAP associées à une faible disponibilité. Plus la texture du sol est fine, plus le pouvoir de sorption est important en raison d'une surface spécifique élevée. Ce paramètre a une influence sur la séquestration et donc la biodisponibilité des HAP (Amellal et al., 2001b; Chen et al., 2010). Comme nous l'avons souligné précédemment, les mécanismes de préservation de la matière organique anthropique seraient dus à l'importante réactivité des phases minérales (Heim and Schmidt, 2007). La nature des minéraux est de ce fait un paramètre clé à considérer dans l'étude de la dynamique des HAP. Aussi, à l'égal de la MO, la composition minéralogique des différentes classes (fractions) granulométriques est variable (**Figure I-10**). Les argiles minéralogiques sont majoritairement retrouvées dans la fraction argileuse, mais aussi dans la fraction limoneuse pour les particules les plus fines. En revanche, elles sont absentes de la fraction sableuse qui est principalement composée de quartz (> 70%), mais aussi de micas (rattachés aux phyllosilicates au même titre que les argiles minéralogiques mais de taille beaucoup plus importante), des silicates divers (feldspaths, pyroxène, etc.) et des oxydes et hydroxydes métalliques.



**Figure I-10.** Diagramme présentant la distribution des minéraux dans chaque fraction granulométrique (terre fine) du sol (Gobat et al., 2010)

L'influence des interactions organo-minérales sur le devenir des HAP dans les sols n'est pas encore clairement comprise et nécessite d'être approfondie (Celis et al., 2006; Jones and Tiller, 1999), notamment en ce qui concerne le rôle des minéraux, d'un point de vue strictement minéralogique et non granulométrique, sur la rétention des HAP. En effet, excepté Krauss and Wilcke (2005), très peu d'auteurs ont étudié la distribution des HAP en fonction de la nature des associations organo-minérales, à partir de séparation densimétrique (§3.1.2) dans les sols.

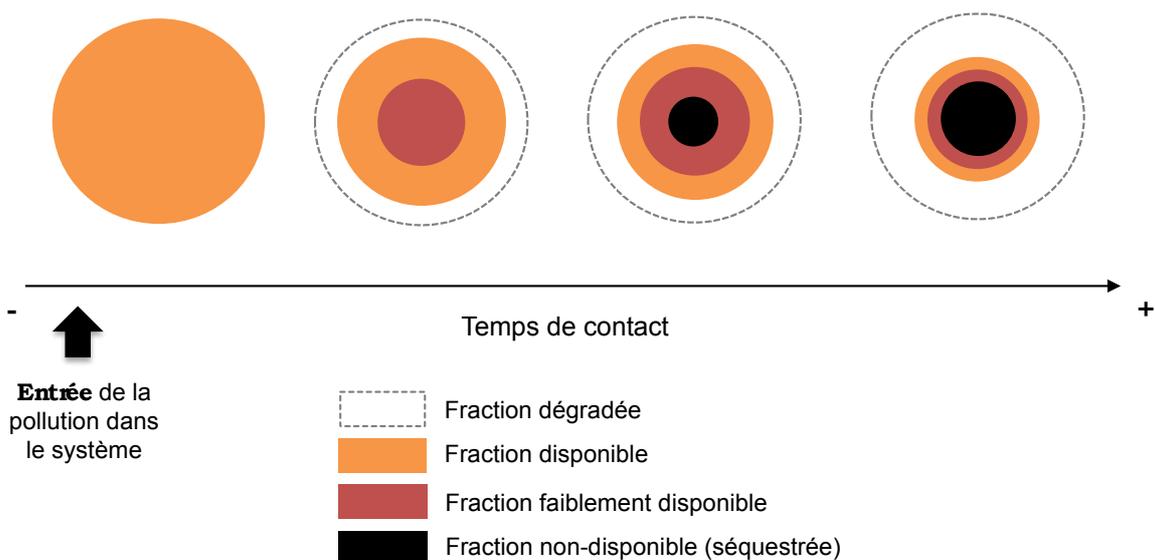
A long terme, les processus de sorption sur la dynamique des HAP conduisent à une diminution ou à une absence de leur extractibilité. Les HAP peuvent diffuser dans les micropores de la fraction minérale ou de certains MO les rendant moins accessibles, et c'est ce qui va aboutir à leur séquestration. Ce processus induit le passage des HAP disponibles vers une forme non disponible (Richnow et al., 1995; Semple et al., 2003). La rétention des HAP va dépendre des caractéristiques physico-chimiques du sol mais aussi des propriétés chimiques des HAP.

#### 2.3.4. Biodisponibilité des HAP et vieillissement de la pollution.

Le devenir et la mobilité des HAP dans les sols sont fortement dépendants de la disponibilité de ces molécules, liée à leur structure chimique (Amellal et al., 2006). La biodisponibilité, quant à elle, représente un des facteurs limitant la dégradation des HAP dans les sols.

Plusieurs définitions sont données pour la biodisponibilité mais la plus récente la définit « comme la capacité que possède un composé chimique présent dans le sol à être absorbé ou métabolisé par un récepteur ou disponible pour interagir avec des systèmes biologiques (Semple et al., 2007). La biodisponibilité des HAP est liée au temps de résidence du contaminant dans le sol. Lorsque le temps de contact entre particules de sol et contaminants augmente, la biodisponibilité diminue (Alexander, 2000; Oleszczuk, 2009). Les sols qui présentent une pollution historique donc ancienne (ex. sol de cokerie) présentent une faible accessibilité et biodisponibilité des contaminants, qui se reflète aussi par une faible extractibilité. La mesure de la biodisponibilité d'un composé organique peut être réalisée à l'aide de différentes procédures, par des extractions non exhaustives (extraction « douce ») utilisant différent type d'extractant. Ainsi, l'extractibilité d'un HAP peut être estimée en utilisant par exemple (i) un solvant organique comme le n-butanol (Macleod and Semple, 2003; Reid et al., 2000; Yang et al., 2010) (ii) un surfactant, l'Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HPCD) (Swindell and Reid, 2006) ou (iii) un polymère poreux solide, comme la résine Tenax (Cofield et al., 2008; Ouvrard et al., 2011; Swindell and Reid, 2006).

La diminution de l'extractibilité et de la biodisponibilité au cours du temps correspond au phénomène dit de vieillissement de la pollution (**Figure I-11**), en anglais « **aging** » (Reid et al., 2000). Un polluant qui est peu ou faiblement biodisponible dans un sol est un polluant qui sera peu ou pas dégradé. Le fait qu'un contaminant soit moins disponible (diminution du risque de transfert à un organisme) dans un sol peut aussi diminuer son écotoxicité.



**Figure I-11.** Phénomène de vieillissement de la pollution « aging » (d'après Dagois, 2015).

Les mécanismes d'interaction et les constituants du sol ont une grande importance dans les phénomènes de vieillissement et ont été intensivement étudiés (Alexander et al., 1997; Chung and Alexander, 1998; Hatzinger and Alexander, 1995; Mader et al., 1997; Nam et al., 1998; Piatt and Brusseau, 1998). Par exemple, Hatzinger and Alexander, 1995 ont montré qu'avec l'augmentation du vieillissement de la pollution dans un sol, artificiellement « agé » avec du phénanthrène, le taux de minéralisation et la quantité de phénanthrène extraite au butanol ont diminué suggérant bien une diminution de la biodégradation avec l'augmentation du temps de contact HAP/matrice du sol. Chung and Alexander (1998) ont mis en évidence une corrélation élevée entre la sequestration du HAP (phénanthrène) et certaines propriétés du sol comme la quantité de carbone organique, et la nanoporosité suggérant leur utilité dans pour prédire la séquestration de certains polluants organiques.

### 2.3.5. Formation d'une fraction non extractible de HAP dans les sols

Les produits issus de la dégradation incomplète des HAP par la microflore et de leur transformation (développés dans le §2.2) interagissent avec les constituants solides du sol et contribuent à la formation de résidus liés non-extractible, qui constituent un réservoir important de polluants organiques (Bollag and Loll, 1983; Kästner et al., 1999). La formation des résidus liés dans le sol peut apparaître à la suite des processus de transformations biotiques et abiotiques (Guthrie et al., 1999). Mais la biodégradation des HAP est l'un des mécanismes clé dans la formation des résidus liés (Kästner et al., 1999; Richnow et al., 1999, 1994). Ce phénomène induit l'activation de la molécule par ajout d'atome d'oxygène par l'intermédiaire d'une enzyme dioxygénase. Le produit nouvellement formé est plus réactif que le composé parent, interagissant plus facilement avec la matière organique du sol pour former des résidus liés (Richnow et al., 1994). Richnow et al. (1998) ont montré que les métabolites peuvent se lier de façon covalente par des liaisons esters, éthers ou C-C à la MO du sol. Aussi, les composés organiques polaires peuvent s'associer avec des sites réactifs présents sur les constituants minéraux du sol (Sposito, 1989) comme nous l'avons évoqué précédemment (§2.3.2).

Cébron et al. (2011), dans une expérimentation utilisant un sol artificiellement contaminé au  $^{13}\text{C}$ -phénanthrène, ont mis en évidence qu'environ 30% du  $^{13}\text{C}$  initialement ajouté ont été piégés dans la matrice du sol, et se stabilise dans le temps comme l'ont aussi souligné Richnow et al. (1999) avec 11% du  $^{13}\text{C}$  issu du HAP apporté (anthracène). Kästner et al. (1994) (1999) ont aussi, dans deux études de biodégradation, quantifié la part de C issu du

HAP marqué ( $^{14}\text{C}$ -anthracène) transformée en résidu lié au cours du temps, qui représente 50% et 45,4% respectivement. De plus, Northcott and Jones (2001) ont rapporté une augmentation de la séquestration de 3 HAP marqués, le  $^{14}\text{C}_9$ -Phénanthrène,  $^{14}\text{C}_{4,5,9,10}$ -Pyrène, et le  $^{14}\text{C}_7$ Benzo[a]Pyrène, dans le sol passant de 1.8 to 5.2%, 3.0 to 9.3%, and 6.3 to 22.7%, respectivement sur une période de temps longue (525 jours).

Les composés, issus de la dégradation et de la transformation des HAP, une fois liés au sol peuvent voir leur toxicité diminuée au cours du temps (Alexander et al., 1997). En effet une fois liés au sol, les métabolites sont généralement moins mobiles et moins disponibles, et par conséquent moins toxiques que lorsqu'ils sont présents sous forme libre (Bollag et al., 1992). Cependant, il est important d'acquérir plus d'informations sur les structures des composés formant ces résidus liés dans le sol pour évaluer leur risque à long terme (Northcott and Jones, 2001), puisqu'une remobilisation de ces produits est possible (Gao et al., 2015).

## 2.4. Devenir des HAP dans la rhizosphère

### 2.4.1. La rhizosphère : une interface dynamique du sol

La **rhizosphère** est définie comme le volume de sol influencé par la présence des racines, et représente l'un des habitats de la surface terrestre les plus dynamiques (Hinsinger et al., 2009). En effet, elle forme une interface biogéochimique, entre racines, microbes et constituants du sol, hautement active. Le fonctionnement de la rhizosphère dépend de facteurs variés : (i) l'architecture du sol, (ii) l'espèce végétale, (iii) la quantité et la composition chimique des exsudats (iv) l'humidité, les flux de nutriments et des modifications chimiques induits par la racine (Hinsinger et al., 2009), (v) les microorganismes présents. Tous les processus de la rhizosphère contribuent aux variations spatiales et temporelles observées (Bourceret et al., 2015; Hinsinger et al., 2005) lui attribuant une forte hétérogénéité. Durant la croissance d'une plante, ses racines synthétisent et libèrent un nombre varié de composés dont notamment des acides organiques, des sucres et des acides aminés (Chaudhry et al., 2004; Kumar et al., 2006; Vencura and Hovadík, 1965). L'exsudation racinaire est l'un des processus clé de la dynamique du carbone dans l'environnement (Breland and Bakken, 1991; Hinsinger et al., 2009; Norton and Firestone, 1996). Les exsudats racinaires fournissent une source de carbone facilement assimilable pour les microorganismes stimulant leur croissance

et leur activité (Keiluweit et al., 2015; Stengel and Gelin, 1998; Walton, 1994). Ainsi, la rhizosphère est une zone biologiquement très active.

#### **2.4.2. Effet de la rhizosphère sur la dissipation des HAP.**

De nombreux travaux ont été réalisés pour préciser le rôle des plantes dans la biodégradation des HAP dans les sols. Toutefois, comme ce qui est mesuré est la concentration extractible en HAP (le plus souvent celle des 16 HAP prioritaires), et que les éventuels produits de transformation ou métabolites ne le sont pas, on parle de dissipation (diminution de la concentration extractible).

Les exsudats racinaires produits dans la rhizosphère stimulent l'activité des microorganismes associés, mais aussi augmentent la biodisponibilité des HAP (Joner et al., 2002; Joner and Leyval, 2003; Mueller and Shann, 2006). Ces processus favorisent ainsi la dégradation des HAP (Gerhardt et al., 2008; Kuiper et al., 2004) en sélectionnant des organismes adaptés (Cébron et al., 2011; Storey et al., 2014). L'environnement des racines dans un sol contaminé par des HAP est souvent enrichi en microorganismes dégradeurs (Binet et al., 2000a). Joner et al. (2002) ont montré que la microflore dégradante augmentait en présence d'exsudats racinaires. Le nombre de bactéries dégradantes augmente aussi lorsque l'on se rapproche de la racine (Corgié et al. 2003 et 2004). De nombreuses études ont montré une dissipation des HAP plus importante dans la rhizosphère d'un sol artificiellement ou historiquement contaminé par rapport à un sol nu (Chiapusio et al., 2007; Liste and Alexander, 2000; Tejeda-Agredano et al., 2013). Les plantes contribuent ainsi à la bioremédiation des HAP dans les sols pollués. De nombreuses études ont mis en avant le potentiel de phytoremédiation de certains végétaux (Corgié et al., 2003; Davis et al., 2002; Kirk et al., 2005) et l'effet des plantes sur la dissipation des HAP (Kirk et al., 2005). Cependant, d'autres études ont présenté des résultats opposés avec aucun effet ou un effet inhibiteur de la rhizosphère (Günther et al., 1996; Kamath et al., 2005). Les travaux de Louvel (2010) et Cébron et al. (2011) ont permis de montrer à l'aide d'expériences en microcosmes, que la présence d'exsudats racinaires ralentissait la biodégradation du PHE, par l'apport de composés carbonés plus facilement métabolisables, tout en stimulant la communauté dégradante. Ces résultats ont permis de mieux comprendre les résultats différents rapportés dans la littérature.

Ces dernières décennies, nombreuses ont été les études sur l'effet de la rhizosphère sur la dissipation des HAP (Aprill and Sims, 1990; Qiu et al., 1994; Reilley et al., 1996; Schwab

and Banks, 1994), prenant en compte aussi le rôle des champignons associés aux racines. En effet, plusieurs travaux montrent un effet des champignons mycorrhiziens associés aux racines sur la dissipation des HAP (Corgié et al., 2006; Joner et al., 2003; Zhou et al., 2009).

La qualité des exsudats, les communautés microbiennes, et les espèces de plante sont les paramètres majeurs qui peuvent expliquer les différences dans la dégradation des HAP au niveau de la rhizosphère (Chiapusio et al., 2007). Ce ne sont pas les seuls processus qui interviennent dans la rhizosphère. En effet, la plante peut stabiliser un contaminant par adsorption sur la surface des racines, ou encore extraire les polluants du sol vers ses parties aériennes (Garbisu and Alkorta, 2001) induisant leur accumulation dans les tissus végétaux (Binet et al., 2000b).

#### **2.4.3. Transfert des HAP dans la plante**

Les plantes prélèvent généralement des teneurs négligeables en HAP (Chaîneau et al., 2016; Goodin and Webber, 1995; Reilley et al., 1996; Sims and Overcash, 1983). Dans un sol anciennement contaminé, une partie des HAP est fortement liée au sol et particulièrement à la MO (Kipopoulou et al., 1999). Dans un sol historiquement contaminé avec une pollution peu biodisponible, l'absorption des HAP par la plante n'est pas attendue (Edwards, 1983; Wild et al., 1992). En effet, de faibles teneurs en HAP ont été mesurées dans les racines et parties aériennes des plantes d'après plusieurs études (Kipopoulou et al., 1999; Binet et al., 2000b; Gao and Zhu, 2004). A titre d'exemple, Binet et al. (2000b) ont montré qu'une faible partie de la concentration initiale extractible en HAP a été retrouvée adsorbée sur les racines (0,006-0,11%), et une faible partie absorbée (0,003-0,16%) dans les racines. Dans les parties aériennes, les teneurs en HAP ont été retrouvées à l'état de traces (0,001%). Edwards, (1983) a aussi montré une translocation limitée des HAP des racines aux parties aériennes en raison de la faible solubilité de ces composés (Simonich and Hites, 1995; Wild et al., 1992). Ainsi, si des HAP sont retrouvés dans les tissus de la plante c'est probablement dû à des dépôts atmosphériques sur la surface des feuilles (Jones et al., 1989). Cependant, le transfert des HAP de la surface de la feuille vers l'intérieur est lent et rare puisque ce sont des molécules aux propriétés hydrophobes et que le transport dans le phloème se fait sur des bases aqueuses (Simonich and Hites, 1995).

## 2.5. Gestion des sols contaminés

Les procédés employés en remédiation peuvent être physico-chimiques (excavation, désorption thermique) ou biologiques (bioremédiation).

**Les techniques physico-chimiques.** Des méthodes physico-chimiques peuvent être appliquées pour le traitement des sites contaminés par des polluants organiques tels que les HAP, comme le venting, la désorption thermique, l'oxydation chimique, le lavage (ADEME, 2012). Ces méthodes bien qu'efficaces, peuvent toutefois être à l'origine de perturbations sévères dans le sol. De plus, elles présentent généralement un coût important et ne peuvent pas être appliquées à de grandes surfaces à traiter.

### **Les techniques biologiques.**

Des méthodes complémentaires ont été développées et utilisent des organismes vivants, sont applicables à des surfaces à traiter plus importantes, mais pour des sols présentant des contaminations modérées en HAP. Il existe plusieurs méthodes de dépollution utilisant les organismes vivants pour remédier la pollution. Contrairement aux méthodes physico-chimiques, elles sont peu coûteuses et plus respectueuses de l'environnement. Parmi ces méthodes, sont notamment retrouvées :

- La bioremédiation utilise une variété de microorganismes capables de dégrader les polluants organiques (Wilson and Jones, 1993). Les microorganismes peuvent être biostimulés par ajout de nutriments (N, P, K) par exemple, ou des stratégies de bioaugmentation peuvent aussi être utilisées en inoculant l'environnement contaminé par une microflore adaptée à la pollution en place (Bamforth and Singleton, 2005).
- La phytoremédiation est une méthode alternative qui utilise des plantes et les microorganismes du sol associés pour éliminer ou dégrader les contaminants de l'environnement (Cunningham et al., 1995). Parmi les techniques de phytoremédiation, la rhizodégradation utilise les systèmes racinaires des plantes pour stimuler la biodégradation (Aprill and Sims, 1990). Les polluants organiques récalcitrants, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) peuvent être dégradés par les microorganismes de la rhizosphère stimulés par le relargage d'exsudats racinaires (Corgié et al., 2003; Karthikeyan and Kulakow, 2003). En effet, la rhizosphère offre un micro-habitat complexe possédant un potentiel intéressant pour améliorer la dégradation des HAP (Rugh et al., 2005). Ces dernières années, de

nombreuses études ont montré une amélioration de la remédiation des sols pollués par des HAP en présence de plantes (Aprill and Sims, 1990; Binet et al., 2001; Gao and Zhu-Li-Zhong, 2005; Joner and Leyval, 2003; Wei and Pan, 2010; Yoshitomi and Shann, 2001)

### **3. Techniques de caractérisation des composés organiques**

Plusieurs méthodes analytiques, généralement couplées à des expérimentations isotopiques, peuvent être utilisées pour étudier la MO du sol : des techniques spectrométriques, de spectroscopie ou d'imagerie. Elles permettent de localiser, d'identifier et de caractériser les composés issus des MO dans un sol.

En dépit des récents progrès, les techniques analytiques nécessitent la plupart du temps un traitement chimique et/ou physique des échantillons de matrices complexes comme le sol. L'objectif principal est de concentrer les composés organiques de façon à les détecter de manière optimale. Ici, nous allons principalement axer sur les méthodes d'extraction et d'analyses appliquées pour l'identification de contaminants organiques.

#### **3.1. Extraction des matières organiques**

##### **3.1.1. Méthodes chimiques : MO extractibles**

Il existe une variété de méthodes chimiques permettant de concentrer les matières organiques à partir de matrices solides. D'un côté, il y a des méthodes dites « douces » d'extraction de la MO à l'eau par exemple (Guigue et al., 2014) qui ne permettent d'extraire qu'une faible proportion de la MO totale. De l'autre, il y a des extractions chimiques sélectives utilisant des solutions alcalines pour extraire les MO suivies d'une étape d'acidification permettant de séparer les acides humiques et fulviques (Baldock et al., 1992). Ces extractions ne sont pas exhaustives et peuvent conduire à des artefacts. Elles sont généralement employées pour l'étude de la MO naturelle mais elles peuvent également l'être pour extraire les contaminants organiques d'une matrice solide (Northcott and Jones, 2000).

Certaines méthodes d'extraction sont typiquement utilisées pour l'analyse des contaminants organiques et de leurs métabolites. Parmi les méthodes conventionnelles

appliquées pour extraire les HAP « totaux », l'extraction accélérée au solvant (ASE) qui est la plupart du temps organique, est couramment utilisée (Antizar-Ladislao et al., 2005; Berset et al., 1999; Wang et al., 2007). Cependant, cette technique ne permet pas d'extraire la totalité des HAP c'est-à-dire ceux fortement liés aux constituants organiques ou inorganiques du sol ou séquestrés. Plusieurs fractions peuvent être distinguées : (i) la fraction disponible obtenue par extraction « exhaustive » au solvant apolaire (comme le dichlorométhane, le n-hexane, ...) [la fraction biodisponible ou labile peut être évaluée à l'aide d'extraction non exhaustive ou douce par application d'une solution de cyclodextrine par exemple (Reid et al., 2000)], (ii) la fraction non-extractible regroupant les composés organiques fortement liés à la phase solide ou séquestrés dans le sol. Cette dernière nécessite des conditions plus astringentes et l'utilisation d'hydrolyse alcaline (NaOH) ou acide de manière à libérer les composés les plus récalcitrants afin qu'ils soient analysés. Certains auteurs ont ainsi utilisé une méthode d'extraction classique au solvant suivie d'une hydrolyse alcaline permettant de libérer les composés fortement associés aux constituants du sol (Eschenbach et al., 1998; Richnow et al., 1998, 1995)

### 3.1.2. Méthodes physiques : fractionnement de la MO

Le fractionnement physique a été utilisé pour séparer la MO du sol en différentes fractions en fonction :

- ✓ De la taille des particules : fractionnement granulométrique (Baldock et al., 1992)
- ✓ De la densité des minéraux : fractionnement densimétrique (Basile-Doelsch et al., 2007; de Junet et al., 2013)

Arshad et al. (1988) par exemple ont utilisé une méthode de fractionnement dans le but de concentrer le carbone et d'augmenter le rapport C/Fe par réduction des fractions enrichies en C (e.g. dithionite de sodium), étape importante en vue d'obtenir une bonne résolution de signal lors des analyses. Certains auteurs ont observé l'effet d'un traitement chimique à l'acide (HCl/HF), appliqué à la suite d'une procédure de fractionnement. La dissolution des phases minérales permet d'isoler la MO, qui est difficilement identifiable lorsqu'elle est associée aux minéraux puisqu'elle ne représente qu'une faible proportion (de Junet et al., 2013; Schmidt and Gleixner, 2005).

Les procédures de fractionnement physique permettent de séparer des « pools » de MO bien spécifiques et de caractériser leur structure chimique, leur état de décomposition et leur biodisponibilité. Les études se focalisent la plupart du temps sur les propriétés de la MO (Baisden et al., 2002; Golchin et al., 1995; Guggenberger et al., 1994), cependant il est beaucoup plus rare de s'intéresser aux caractéristiques minéralogiques de ces fractions (Kaiser and Guggenberger, 2003; Shang and Tiessen, 1998; Sollins et al., 2006).

Ces traitements ont aussi été utilisés pour étudier la distribution et évaluer la disponibilité des HAP dans différentes fractions granulodensimétriques (Amellal et al. 2001 et Pernot et al. 2014) mais aussi au sein de fractions densimétriques (Wilcke and Krauss, 2005 et El Mufleh et al. 2014) comme nous l'avons vu précédemment.

### 3.2. Marquage isotopique des composés organiques

Les techniques utilisées pour caractériser les composés organiques d'une matrice solide nécessitent souvent l'utilisation de marqueurs isotopiques (stable ou radioactif). Les éléments les plus couramment utilisés lors d'expérimentations isotopiques sont le carbone qui possède deux isotopes stables le carbone 12 ( $^{12}\text{C}$ , abondance naturelle : 98,9 %) et le carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ , abondance naturelle : 1,1%) et l'azote dont les deux isotopes stables sont l'azote 14 ( $^{14}\text{N}$ , abondance naturelle : 99,64 %) et l'azote 15 ( $^{15}\text{N}$ , abondance naturelle : 0,36 %). De nombreuses études qui portent sur la dynamique (transformation, transport, stabilisation, stockage ...) de la matière organique dans les sols, utilisent des expérimentations de marquage isotopique (Hatton et al., 2015; Kögel-Knabner, 1997; Mueller et al., 2012; Remusat et al., 2012a; Salati et al., 2008). Les isotopes stables sont aussi intensément utilisés lors d'études sur les processus régissant le devenir de contaminants dans l'environnement (Manefield et al., 2007; H. H. Richnow et al., 2000; Richnow et al., 1999; Smernik et al., 2006). Des isotopes radioactifs peuvent également être utilisés (Doick et al., 2005; Streibich et al., 1999), mais leur instabilité ne font pas d'eux les meilleurs candidats et sont donc plus rarement choisis.

### 3.3. Méthodes analytiques : pyrolyse et thermodésorption

La **pyrolyse** analytique (**pyGCMS**) (de Junet et al., 2013; Northcott and Jones, 2001) et la **thermodésorption (TD)** (Biache et al., 2008; Northcott and Jones, 2000) sont deux

techniques fortement utilisées pour caractériser la structure chimique de la MO (Saiz-Jimenez, 1994; Schnitzer and Schulten, 1995). La pyrolyse et la TD se distinguent par la température à laquelle est chauffé l'échantillon à analyser. En pyGCMS, les produits de pyrolyse sont obtenus par craquage des composés parents et en TD les composés sont désorbés/libérés à une température inférieure à la température de cracking utilisée en pyrolyse (qui permet de casser les liaisons des macromolécules en fragments plus petits).

**La PyGCMS** est une méthode de dégradation thermique très sensible pour la caractérisation au niveau moléculaire des composés organiques dont les HAP (Bucu et al., 2004; De la Rosa et al., 2008; Kogel-Knabner, 1997). Généralement, les composés produits par pyrolyse sont séparés par chromatographie avant d'être identifiés par un spectromètre de masse. Cette technique est destructive mais seulement quelques milligrammes d'échantillons sont nécessaires. Cependant, le choix des conditions chromatographiques induit une sélectivité sur les produits de pyrolyses caractérisés (Dignac et al., 2006). Par exemple, pour pouvoir identifier les composés polaires d'un échantillon de sol, de l'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH) peut être ajouté afin de métyler les groupements oxygénés (carboxyle, hydroxyle, etc.) par transformation des acides carboxyliques et des groupes hydroxyles en esters et éthers métylés (Del Rio and Hatcher, 1998) pour rendre ces composés polaires plus volatils et donc détectables (Knicker, 2004)

**La TD** couplée à la GCMS a été employée comme une technique d'extraction et une méthode d'analyse rapide pour les contaminants organiques du sol (Maguire et al., 1995; Robbat et al., 1992). Uzgiris et al. (1995) ont utilisé la TD pour déterminer la distribution des HAP entre la forme labile et la forme récalcitrante. La métylation au TMAH est aussi utilisée en TD pour convertir les composés polaires en dérivés moins polaires les rendant visibles durant l'analyse (Hatcher and Clifford, 1994; Saiz-Jimenez, 1994). De ce fait, il est envisageable de séparer et de détecter davantage de produits que ceux qui sont observés sans ajout de TMAH. De plus, ces composés possédant des groupements fonctionnels oxygénés peuvent être des produits issus de la dégradation des HAP par exemple, d'où l'importance de pouvoir les identifier.

Parmi les techniques de spectrométrie la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie (GC-MS) classique est régulièrement utilisée dans l'analyse des HAP et des métabolites associés. Cependant, seules les matières organiques extraites peuvent être

détectées par cette méthode à la différence de la pyrolyse et de la TD qui sont en mesure d'analyser l'échantillon entier sans nécessité de le prétraiter. Par ailleurs, l'identification des HAP et de leurs métabolites peut être réalisée à l'aide de chromatographie liquide à haute performance (HPLC). A l'image de Meyer and Steinhart (2001) qui ont identifié 30 métabolites issus des HAP avec une prédominance de cétones aromatiques, quinones, et composés hydroxylés. Ils se sont focalisés sur l'étude de la formation et de l'accumulation des métabolites durant la dégradation des HAP. Néanmoins, la plupart des métabolites extractibles ne sont présents que sur une période courte puisqu'ils peuvent soit être dégradés, soit former des résidus liés. Et notamment lorsque les conditions expérimentales favorisent la biodégradation des composés parents par amendement organique (Antizar-Ladislao et al., 2005; Puglisi et al., 2007; Siméon et al., 2008) ou par ajout d'un inoculum microbien (Binet et al., 2001; Kästner et al., 1999; Mueller and Shann, 2006). Wischmann and Steinhart (1997) ont aussi identifié par HPLC et GCMS, l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque issu du phenanthrene et le 9-fluorenone et 9-fluorenone comme produits de dégradation du fluorone. Mueller and Shann (2006) n'ont identifié aucun métabolite après analyses en GC-MS des extraits. Binet et al. (2001) ont également recherché d'éventuels produits de dégradation des HAP en utilisant la GC-MS et ont identifié et quantifié un unique produit issu de l'oxydation de l'anthracène : l'anthraquinone.

Régulièrement lorsqu'il est question d'étudier la dégradation des HAP dans les sols, des mesures et observations macroscopiques sont employées. Avec des techniques comme la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN), des informations à l'échelle de la molécule peuvent être fournies.

### 3.4. Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique est abondamment utilisée dans les études de caractérisation de la matière organique dans les sols (Baldock et al., 1992; Kogel-Knabner, 2000; Lu et al., 2000). Elle permet d'identifier la structure moléculaire des composés organiques par identification des groupements fonctionnels à partir d'échantillons solides ou liquides. C'est une technique de spectrométrie fréquemment utilisée en chimie organique, et qui vient compléter d'autres techniques telle que la spectrométrie de masse (Baldock et al., 1992; Kogel-Knabner, 2000, 1997). Elle présente le double avantage d'être non destructive et indépendante des quantités de phases minérales présentes dans les échantillons analysés.

Cependant, elle est très sensible au fer paramagnétique et nécessite de concentrer et d'isoler la matière afin d'obtenir un signal.

Les spectres de RMN possèdent des bandes caractéristiques, correspondant au déplacement chimique du  $^{13}\text{C}$ , dont les principales sont consignées dans le **Tableau I-3**. La résonance magnétique nucléaire est reconnue comme étant un outil analytique puissant pour étudier la structure de molécules organiques dans des systèmes complexes, tel que le sol.

**Tableau I-3.** Bandes caractéristiques retrouvées pour les spectres RMN du  $^{13}\text{C}$  (Wilson et al., 1987)

Groupements chimiques	Composés organiques	Déplacement chimique (ppm)
<b>C-H</b>	Carbone aliphatique	0-55
<b>C-N</b>	Amines, amides, protéines	40-55
<b>O-CH<sub>3</sub></b>	Groupe méthoxy	55-60
<b>C-O</b>	Alcools aliphatiques	60-90
<b>O-C-O</b>	Carbone anomérique	90-110
<b>Φ</b>	Carbone aromatique	95-165
<b>Φ - O</b>	Esters aromatiques, éthers, phénols	135-165
<b>O=C-O ; O=C-N</b>	Acides carboxyliques, esters, amides	160-190
<b>O=C-C=C</b>	Falvones, quinones	170-200
<b>O=C-C</b>	Cétones aliphatiques et aromatiques	190-220

La formation de métabolites durant la biodégradation des HAP a été intensivement étudiée par HPLC et GCMS (Meyer and Steinhart, 2001; Wischmann et al., 1996; Wischmann and Steinhart, 1997). Les informations apportées concernant les produits de dégradation sont quantitatives et ne permettent donc pas d'identifier la structure chimique des composés formés. Mais des méthodes comme la  $^{13}\text{C}$ -RMN permettent de caractériser la structure des molécules et d'identifier les groupes fonctionnels présents.

Nous avons préalablement indiqué, au travers de différentes études utilisant le marquage isotopique, qu'au cours des processus de dégradation des HAP un pourcentage important du composé initialement ajouté au sol se retrouvait sous forme de résidus liés (Cébron et al., 2011; Richnow et al., 1999). De nombreuses études ont mis en évidence qu'une partie des composés marqués s'accumulaient sous une forme non-extractible dans les sols incubés (Burgos et al., 1996; Guthrie and Pfaender, 1998; Richnow et al., 1995, 1994; Verstraete and Devliegher, 1997). Cependant, les informations concernant les « résidus liés »

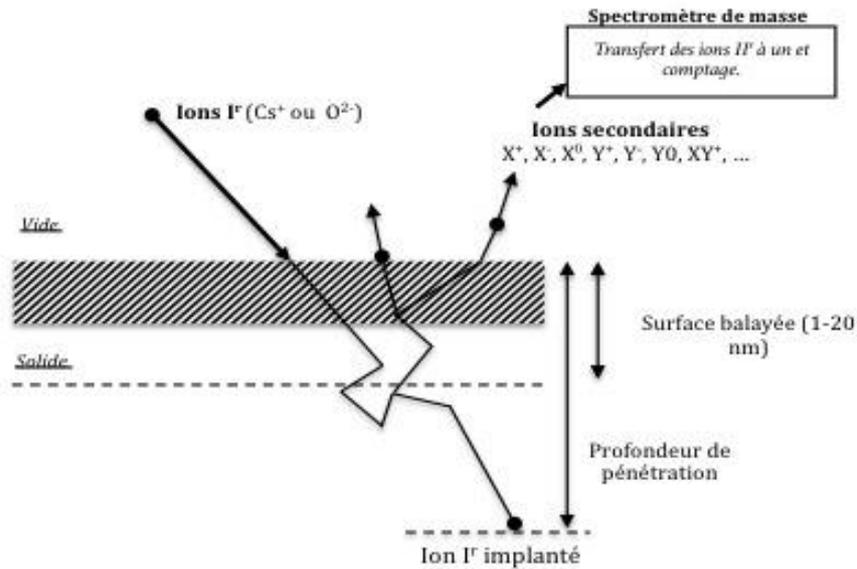
non-extractibles au solvant s'avèrent limitées (Guthrie et al., 1999). La technique de résonance magnétique nucléaire peut être utilisée de façon à déterminer les interactions formées entre les polluants marqués et les constituants du sol. Pour la première fois, Käcker et al. (2002) ont étudié la transformation de deux HAP en résidus liés en utilisant la spectroscopie  $^{13}\text{C}$ -RMN. Les produits de dégradation associés à l'humus ont été clivés et ensuite analysés. Des métabolites du PHE associés par des liaisons ester à l'acide humique ont été détectés, pour la première fois par  $^{13}\text{C}$ -RMN, tels que l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque, l'acide *ortho*-phtalique et l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque. Richnow et al. (1998, 1997, 1994) ont aussi procédé à l'identification des produits de dégradation formant la fraction non-extractible dans le sol en utilisant une méthode de clivage chimique sélective.

#### 4. La spectrométrie de masse à ions secondaires

La NanoSIMS a largement été utilisée au cours de ces dernières années dans de nombreux domaines d'études pour suivre le devenir d'éléments et d'isotopes dans des organismes vivants ou dans des systèmes complexes et hétérogènes, comme le sol ou la rhizosphère à très petite échelle. Toutefois, très peu d'études se sont focalisées sur le devenir des HAP au sein de ces environnements à une échelle micrométrique.

##### 4.1. Principe général de la SIMS

Un faisceau d'ions primaires balaye la surface d'un échantillon et entraîne son érosion par émission d'ions secondaires. L'impact des ions primaires avec les éléments constitutifs de l'échantillon va provoquer une cascade de collisions atomiques et la production d'ions et d'électrons secondaires (**Figure I-12**). Le faisceau peut être constitué d'ions césium ( $\text{Cs}^+$ ) ou d'oxygène ( $\text{O}^{2-}$ ) suivant la nature de l'échantillon à analyser, et l'objectif de l'étude. Le faisceau d'ions primaires  $\text{O}^{2-}$  favorise la formation des ions secondaires négatifs et le faisceau  $\text{Cs}^+$  d'ions secondaires positifs. Le diamètre du faisceau incident varie d'une source à l'autre, mais permet d'avoir une très bonne résolution spatiale de 90 à 150 nm (dans certains cas < 90 nm).



**Figure I-12.** Schéma du principe physique de la NanoSIMS (adapté de Hoppe et al., 2013). Les ions  $I^+$  entraînent l'éjection d'atomes et petites molécules parmi lesquelles une partie est ionisée. Les ions secondaires sont ensuite transférés à un spectromètre de masse et comptés les uns après les autres.

Deux modes existent en SIMS : le mode statique et le mode dynamique. Le mode d'analyse dynamique donne accès à des informations supplémentaires (élémentaires et isotopiques) pour un échantillon, mais ne fournit pas d'information sur les structures moléculaires contrairement au mode statique (ex : ToF SIMS). Cependant la SIMS dynamique a pu être développée, pour donner une nouvelle génération de sonde avec un pouvoir hautement résolutif : la **NanoSIMS**.

La NanoSIMS est une microsonde nouvelle génération développée par Slodzian pour CAMECA. A partir des années 70, elle est utilisée dans de nombreux domaines de recherche comme les sciences de la Terre, des matériaux et en astronomie notamment. Au début des années 90, elle apparaît dans d'autres domaines tels que la géologie, la minéralogie, etc. (Pacholski and Winograd, 1999; Slodzian et al., 1992) puis sa gamme de recherche est élargie aux domaines de la biologie dans les années 2000 (Behrens et al., 2008; Guerquin-Kern et al., 2005; Hallégot et al., 2006; Musat et al., 2008; Peteranderl and Lechene, 2004). Son arrivée tardive en science du vivant est en partie due aux contraintes imposées par la préparation d'échantillons biologiques qui nécessite de travailler sous ultravide (Guerquin-Kern et al., 2005; Peteranderl and Lechene, 2004). Grâce à sa haute résolution spatiale et sa grande sensibilité, la NanoSIMS a vite été reconnue comme offrant de nouvelles perspectives de recherche. A ce jour, il y a plus de 30 instruments opérationnels à travers le monde.

La NanoSIMS présente de nombreux avantages comparés à d'autres techniques d'imagerie. Elle est formée d'une sonde ionique, dynamique à double focalisation (coaxiale), à secteur magnétique et à collecteur multiple lui conférant une haute résolution spatiale (<50 nm), une grande sensibilité (ppm) et une haute résolution de masse ( $M/dM > 1000$ ). De plus, elle permet de détecter simultanément de 5 à 7 éléments au sein d'un même volume érodé.

La zone de balayage est assez restreinte et se situe généralement entre 5 et 50  $\mu\text{m}$ , mais peut atteindre 150  $\mu\text{m}$ . L'ensemble du système est maintenu sous ultravide (allant de  $10^{-10}$  Torr à  $10^{-8}$  suivant la localisation dans l'appareil). Le maintien de l'instrument sous ultravide permet de réduire la probabilité de collision des particules et donc d'affecter le parcours des ions.

#### 4.2. Expérimentation isotopique couplée à la NanoSIMS

La sensibilité élevée de la NanoSIMS offre la possibilité de suivre un substrat marqué (par un isotope, e.g.  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) ajouté à un système, et de le localiser à l'échelle micrométrique voir nanométrique. Par conséquent, l'utilisation de cette technique d'imagerie est particulièrement pertinente dans des expérimentations utilisant des traceurs isotopiques. Les isotopes stables sont préférés aux isotopes radioactifs pour leur stabilité et leur innocuité. De nombreux éléments possèdent un isotope avec une faible abondance naturelle, c'est le cas du carbone et de l'azote couramment utilisés dans des études de marquage isotopique. Ils possèdent respectivement deux isotopes stables, les abondances relatives sont de 98,99% pour le  $^{12}\text{C}$ , 1,11% pour le  $^{13}\text{C}$  (Mariotti, 1991), de 99,64 % pour le  $^{14}\text{N}$  et de 0,36% pour le  $^{15}\text{N}$ . De nombreuses études suivent le devenir de composés (e.g. nutriments, contaminants) utilisant le marquage isotopique couplé à la NanoSIMS dans des domaines variés.

Des études récentes ont été effectuées à très petites échelles pour localiser un composé organique marqué ( $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ ) au sein de microagrégats, de surfaces minérales, de microorganismes et de racines (Blair et al., 2006; Cliff et al., 2002; Clode et al., 2009; Derito et al., 2005; Herrmann et al., 2007a; Herrmann et al., 2007b; Keiluweit et al., 2012; Pumphrey et al., 2009).

Ainsi, Musat et al. (2012) ont démontré le potentiel de la NanoSIMS pour identifier, quantifier et visualiser l'incorporation d'un substrat marqué par des microorganismes au sein

de communautés microbiennes complexes. En biologie cellulaire aussi des études ont montré l'utilité d'associer ces outils, comme celle de Kleinfeld et al. (2004) qui ont suivi le transport d'un acide gras marqué au  $^{13}\text{C}$  à travers les membranes d'adipocytes. Römer et al. (2006) ont étudié l'absorption et la distribution cellulaire de peptide recombiné marqué au  $^{15}\text{N}$ . (Lechene et al. (2006) soulignent que la SIMS permet pour la 1<sup>ère</sup> fois d'imager et de quantifier des molécules marquées par des isotopes stables à l'intérieur des cellules.

Des travaux récents ont permis de cartographier et de quantifier des composés organiques (Hallégot et al., 2004), des halogènes (Guerquin-Kern et al., 2005; Hallégot et al., 2006), des métaux (Audinot et al., 2004; Galli Marxer et al., 2005; Krein et al., 2008; Quintana et al., 2006), et de réaliser des mesures de ratios isotopiques (Audinot et al., 2006; Lechene et al., 2006; Popa et al., 2007) dans des cellules ou tissus.

La NanoSIMS peut être aussi utilisée pour comprendre le métabolisme microbien (reflété par la distribution de traceurs élémentaires) dans des cellules seules en culture pure (Clode et al., 2007; Lechene et al., 2006; Popa et al., 2007) ou au sein d'échantillons environnementaux (Behrens et al., 2008; Clode et al., 2007; Herrmann et al., 2007b; Lechene et al., 2006; Li et al., 2008; McMahan et al., 2006; Popa et al., 2007).

L'étude des sols se fait généralement à partir d'échantillons souvent altérés par des prétraitements nécessaires aux analyses (Mueller et al., 2013). Cependant, l'arrivée de la NanoSIMS a rendu possible l'observation de processus se produisant à des échelles très fines aux interfaces biogéochimiques, où de nombreuses interactions entre MO, minéraux et microorganismes ont lieu et contrôlent le devenir à long terme du carbone, des nutriments et des polluants (Lehmann et al., 2007 ; Schmidt et al., 2011)

Plusieurs études ont été réalisées sur la dynamique de la MO du sol au sein de complexes organo-minérales (Hatton et al., 2015; Heister et al., 2011; Moni et al., 2012). Traditionnellement, les études des associations organo-minérales se font à partir de procédures de fractionnement physique, isolant les particules en fonction de leur taille ou de leur densité (Balesdent et al., 2000; Eusterhues et al., 2005; Kögel-Knabner et al., 2008). Or, la NanoSIMS offre la possibilité d'étudier ces associations organo-minérales structurellement intacts, en révélant les assemblages préférentiels qui peuvent avoir lieu entre certaines MO et certains minéraux du sol. Heister et al. (2012) ont montré que les MO étaient principalement associées aux minéraux argileux sous la forme de patches isolés et très peu sur les oxydes de fer. Remusat et al. (2012) ont pu visualiser des microsites enrichis en  $^{15}\text{N}$  à partir de particule de sol intacte, et couplée à une technique de STMX-NEXAFS ils ont suggéré que cet

enrichissement était lié à la présence de métabolites microbiens. Aussi, Keiluweit et al. (2012) à l'aide de la technique NanoSIMS, ont été capables de suivre la dynamique à microéchelle de la MO marquée et de son association préférentielle dans les microenvironnements de sols. Heister et al. (2012) ont montré que des sols artificiels (obtenus après différents mélanges de constituants minérales et organiques) pouvaient être différenciés au travers des images NanoSIMS en distinguant les ions dérivés de la MO ( $^{12}\text{C}^-$  et  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ) et les ions issus des minéraux ( $^{28}\text{Si}^-$ ,  $^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^-$ , and  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$ ). Ils ont aussi mis en avant le fait de pouvoir distinguer les argiles des oxydes de fer, et de différencier le charbon de la matière organique naturelle en utilisant le rapport  $^{12}\text{C}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ . Afin de déterminer une méthode de calibration interne adéquate pour quantifier les rapports élémentaires et isotopiques en NanoSIMS. Hatton et al. (2012) ont procédé à une série de mesures successives à petite (NanoSIMS) et grande échelle (EA-IRMS) des rapports  $^{12}\text{C}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  et  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  au sein de fractions densimétriques de sol

Jusqu'à présent la spectrométrie à ions secondaires a été utilisée pour suivre la distribution de métaux (ex. Cd, Cr), de métalloïdes (ex. As), d'halogène et de polluants organiques dans des cellules microbiennes (Eybe et al., 2008), dans les plantes (Lombi et al., 2011; Mangabeira et al., 2006; Moore et al., 2011; Tartivel et al., 2012), dans les tissus animaux (Eybe et al., 2009) et dans les tissus humains (Audinot et al., 2004). Cependant, l'étude du devenir de polluants organiques dans les plantes et les cellules bactériennes combinée à la NanoSIMS reste à être investiguer davantage. Quelques travaux, et notamment ceux de Chandra et al. (2008) et Derito et al. (2005) utilisent un polluant organique modèle, le  $^{13}\text{C}$ -phénol, pour comprendre les processus de biodégradation par des populations bactériennes du sol.

Des techniques de microscopies, de spectrométries ou encore moléculaires sont couramment utilisées en complément de la NanoSIMS pour compléter les résultats obtenus à partir des images acquises. Par exemple, Moore et al. (2011) et Clode et al. (2009) ont utilisé l'approche NanoSIMS combinée à la MET pour localiser un substrat (organique ou inorganique) au sein d'un échantillon exposé.

Le couplage de la NanoSIMS à des approches moléculaires a été fréquemment utilisé, et s'avère être très pertinent pour le suivi des activités métaboliques de cellules microbiennes individuelles (Lechene et al., 2006). Les techniques d'identification par « stable isotope probing » (SIP) et par hybridation in situ (FISH) sont parmi les méthodes de biologie moléculaire les plus couramment utilisées en complément des analyses NanoSIMS. Behrens

et al. (2008) ; Li et al. (2008) ; Musat et al. (2014) ont ainsi étudié l'activité métabolique de microorganismes et les fonctions d'une espèce au sein d'une communauté complexe en couplant l'outil NanoSIMS à la FISH. Le couplage des approches isotopiques, NanoSIMS et SIP sont désignées sous le terme « NanoSIP » (Pett-Ridge and Weber, 2012) et permettent d'identifier des microorganismes, de visualiser directement les fonctions microbiennes et de les situer dans des communautés complexes (Kuypers and Jorgensen, 2007).

## 5. Objectifs de la thèse

L'état des connaissances actuelles montre que le devenir des HAP dans les sols est gouverné par de nombreux mécanismes dont les principaux sont la biodégradation et la sorption aux constituants du sol. De nombreuses études se sont concentrées sur les HAP extractibles au solvant (Cofield et al., 2007; Maliszewska-Kordybach, 2005; Song et al., 2002) et sur la fraction qui est dissipée. Cependant, la fraction résiduelle et non-extractible est tout aussi importante dans l'étude du devenir des HAP. D'après les travaux de Cébron et al. (2011), environ 30% du  $^{13}\text{C}$  issu du PHE ont été piégés dans le sol après 12 jours d'incubation. La nature des produits retrouvés dans cette fraction reste encore inconnue. L'identification de ces composés, provenant de la transformation des HAP et liés au sol, nécessite encore d'être précisée.

Les techniques actuelles offrent la possibilité de marquer des contaminants organiques à l'aide d'isotopes stables pour suivre (i) leur distribution et (ii) leur transformation dans les sols (Doick et al., 2005; Eschenbach et al., 1998; Kästner et al., 1999; Macleod and Semple, 2003; Northcott and Jones, 2001; Richnow et al., 1998) à l'échelle de l'échantillon (macroscopique) mais également à des échelles plus fines (jusqu'à l'échelle nanométrique) permettant d'aller investiguer dans les microenvironnements du sol et de la rhizosphère par exemple. C'est le cas de la NanoSIMS qui, couplée à des expérimentations isotopiques, offre la possibilité de suivre un substrat marqué et de le localiser à très petites échelles (Hatton et al., 2012). Au cours de la revue bibliographique, nous avons évoqué son utilisation dans de nombreux domaines pour visualiser la distribution de matériels organiques (Hallégot et al., 2006) et inorganiques (Audinot et al., 2004; Galli Marxer et al., 2005; Krein et al., 2008; Quintana et al., 2006) dans des systèmes plus ou moins complexes comme le sol. Toutefois, très peu d'études se sont focalisées sur le devenir de polluants organiques dans les

microenvironnements du sol au moyen de cette technique (Derito et al., 2005; Pumphrey et al., 2009).

Les études afférentes aux mécanismes contrôlant le devenir des HAP soulignent le rôle prédominant de la MO du sol vis-à-vis des contaminants organiques hydrophobes, mais la contribution de la fraction inorganique reste moins bien connue et a suscité aussi quelques investigations (Hundal et al., 2001). Des travaux récents ont montré que des composés organiques très hydrophobes pouvaient fortement interagir avec certains minéraux argileux, et par conséquent que la composante minérale aurait également un rôle significatif à jouer dans la rétention de polluants organiques (Doick et al., 2005). Toutefois, les connaissances sur l'influence des phases minérales dans la dynamique des HAP nécessitent d'être approfondies.

L'objectif principal de la thèse est ainsi de préciser le devenir des HAP dans le sol et plus exactement de prendre en compte :

- ☞ L'influence de la plante sur la dynamique des HAP et des composés organiques issus de leur transformation, et plus précisément sur leur localisation dans les compartiments du sol et de la rhizosphère (particules de sol, microorganismes, racines) à différentes échelles spatiales (globale et micrométrique) en couplant des techniques d'analyses (**Chapitre III, IV & V**).
- ☞ L'identification des produits de transformation des HAP dans les compartiments organiques et organo-minéraux d'un sol rhizosphérique, et particulièrement dans la fraction non-extractible (au solvant) du sol afin d'identifier la nature des composés organiques impliqués dans la formation du résidu lié (**Chapitre V**).
- ☞ L'influence du compartiment organique et des compartiments organo-minéraux dans la distribution et la rétention (i) des HAP dans un sol historiquement contaminé et (ii) d'un HAP et de ses produits dérivés dans un sol sous l'influence d'une plante (**Chapitre V & VI**).

A cet effet, deux approches ont été utilisées : (a) une approche en mésocosmes avec un sol planté et un traçage par un HAP modèle marqué au  $^{13}\text{C}$  et (b) une approche de caractérisation de la distribution et de la localisation des HAP et des composés organiques dérivés dans un sol historiquement contaminé et dans un sol fraîchement contaminé par des HAP (**Figure I-13**). Ces approches ont été associées à l'utilisation de techniques comme la NanoSIMS, la  $^{13}\text{C}$ -RMN et la GC-MS.

Afin de comprendre le comportement et la localisation des HAP dans le sol et la rhizosphère à l'échelle globale et très fine, nous avons choisi de mettre en place une expérimentation de laboratoire utilisant un sol planté de ray-grass artificiellement contaminé par un HAP marqué au carbone 13, le  $^{13}\text{C}$ -phenanthrène ( $^{13}\text{C}$ -PHE). Cette expérience a permis de faire un bilan du devenir du HAP ajouté dans les différents compartiments (sol, plante) et d'étudier la distribution, la localisation du  $^{13}\text{C}$ -PHE ajouté et l'identification des métabolites issus de sa dégradation.

Le monitoring du  $^{13}\text{C}$ -PHE a pu être réalisé au cours d'une cinétique de 21 jours en utilisant des techniques variées et complémentaires :

 La **localisation du  $^{13}\text{C}$ -PHE et des produits néoformés** associés, les  $^{13}\text{C}$ -métabolites (i) à une échelle macroscopique a été précisée par des mesures du rapport isotopique ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) dans le sol et la plante en utilisant un spectromètre de masse à rapport isotopique (IRMS) et (ii) à une échelle microscopique au moyen d'un spectromètre de masse à ions secondaires haute résolution (NanoSIMS).

 L'**identification des  $^{13}\text{C}$ -métabolites** issus de la dégradation du composé parent, le  $^{13}\text{C}$ -PHE, a été réalisée par GC-MS pour les composés organiques extractibles au solvant, et par py/TD/GCMS et par  $^{13}\text{C}$ -RMN pour les résidus liés du sol, et non extractibles

Puis, pour appréhender l'influence des phases minérales sur la distribution, la localisation et la rétention des HAP dans un sol historiquement contaminé, la deuxième approche a consisté à utiliser une procédure de fractionnement par densimétrie sur un sol historiquement contaminé avant et après ajout d'une contamination fraîche. Les différentes fractions obtenues ont été caractérisées par des analyses élémentaires, organiques et minéralogiques. Quelques études se sont focalisées sur l'effet de la structure d'un sol et l'influence des classes granulométriques sur la dynamique des HAP dans un sol anciennement contaminé (Amellal, et al., 2001 ; Pernot et al., 2013) mais très peu sur l'aspect minéralogique dans le cas de sols pollués.

En résumé (**Figure I-13**), l'approche choisie devait permettre :

- ❑ La **localisation** d'un HAP marqué dans le sol et la rhizosphère en couplant expérimentation isotopique et technique d'imagerie (**NanoSIMS**). Le Chapitre III a été dédié à la compréhension et le traitement des images acquises en NanoSIMS (**Chapitre III**) permettant l'analyse des images et leur interprétation (**Chapitre IV**).

- ❑ L'**identification des composés néoformés** issus de la dégradation d'un HAP marqué par des approches moléculaires afin d'apprécier sa transformation et sa disponibilité dans le sol planté (**Chapitre V**).
- ❑ La **distribution et la rétention des HAP** à partir d'un sol historiquement contaminé ou fraîchement contaminé (**Chapitre VI**) et la localisation d'un HAP et de ses produits de transformation (**Chapitre V**) dans les différents compartiments organo-minéraux du sol par une approche minéralogique.

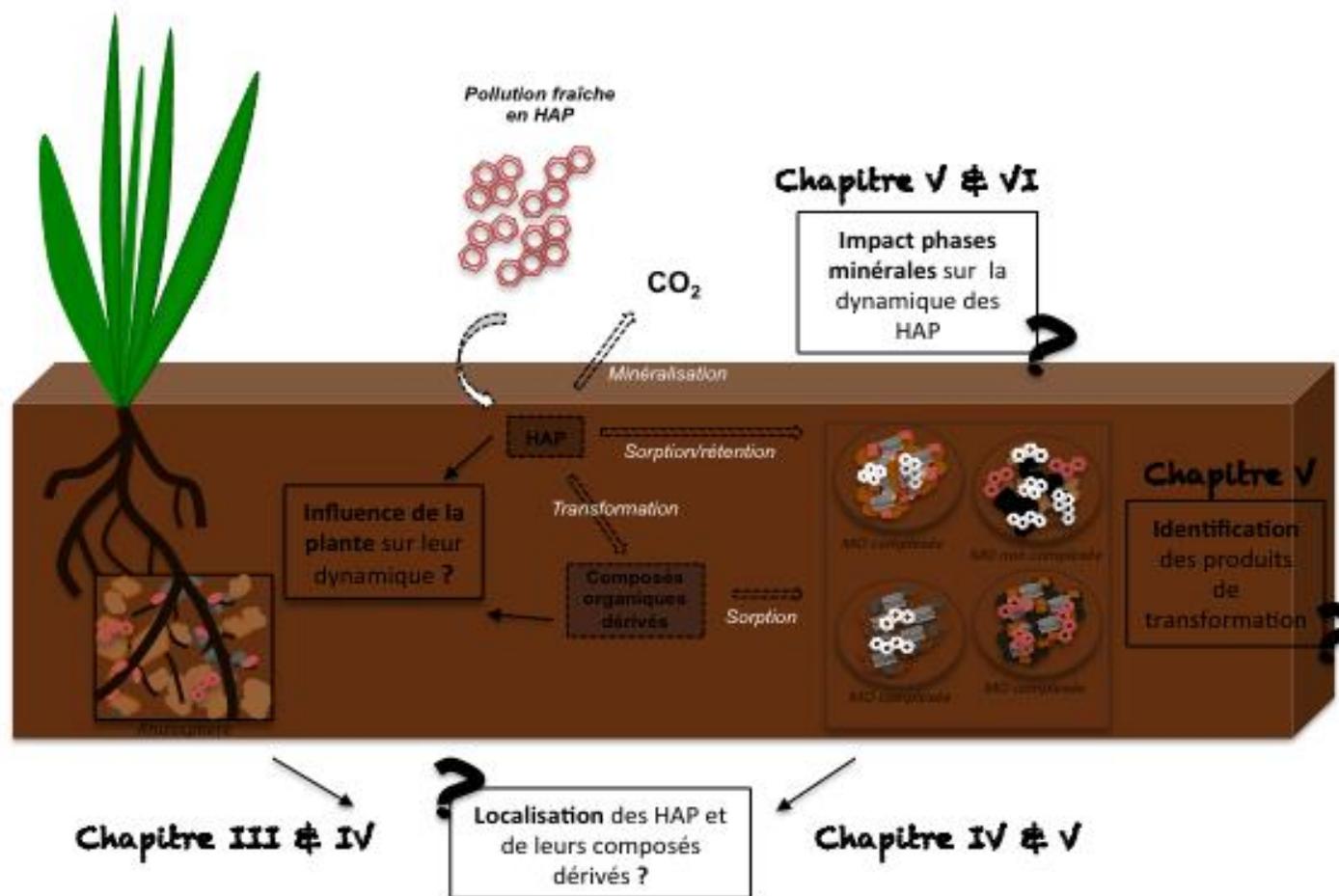


Figure I-13. Schéma de synthèse des objectifs de recherche et des verrous à lever au cours de ce travail



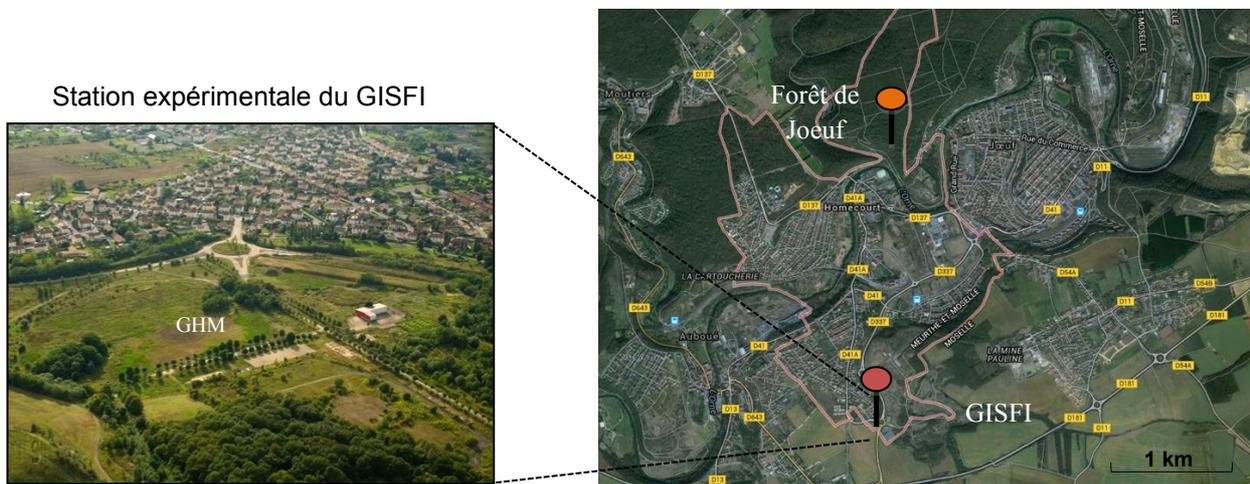
## Chapitre II. Matériel et méthodes



Ce chapitre présente successivement les sols utilisés, les dispositifs expérimentaux ainsi que les analyses réalisées au cours de ce travail. Le matériel et les méthodes inhérents à l'utilisation de la NanoSIMS sont présentés dans ce chapitre, mais la partie « traitement des images » sera développée dans le Chapitre III dédié à l'approche méthodologique et analytique de la NanoSIMS.

## 1. Présentation des sols étudiés

Deux types de sols ont été utilisés au cours des expérimentations de laboratoire : un sol de friche industrielle et un sol forestier. Ces deux sols ont été prélevés en Lorraine et sont espacés de moins de 5km l'un de l'autre.



**Figure II-1.** Localisation du site de la station expérimentale du GISFI à Homécourt, et de la forêt de Joëuf.

### 1.1 Sol de friche industrielle

Le sol contaminé a été prélevé sur la friche industrielle de la station expérimentale du GISFI (Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles) située à Homécourt (Meurthe & Moselle). La friche industrielle a abrité par le passé deux cokeries successives (de 1922 à 1980) qui ont engendré des sols majoritairement contaminés aux éléments en traces métalliques (ETM) et aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Le sol a été prélevé dans la zone dite « moyennement contaminée » (GHM, **Figure II-1**).

Le sol prélevé à Homécourt possède une texture sablo-limoneuse et une teneur en HAP moyenne de 1396 mg.kg<sup>-1</sup> (**Tableau II-1**). Les teneurs en carbone organique y sont très

élevées et 10 fois plus que dans le sol forestier (§1.2), ceci s'explique par la prédominance de matière organique d'origine anthropogénique dans le sol de cokerie. La matière organique naturelle dans ce sol ne représente que 0,7% de la fraction organique (Biache et al., 2013). De plus, il présente un pH élevé pouvant se justifier par les fortes teneurs en calcaire.

## 1.2 Sol forestier

Le sol forestier (SF) a été échantillonné dans la forêt de Joeuf (54) à environ 5 km de la station expérimentale d'Homécourt (GISFI) (**Figure II-1**). Deux horizons distincts ont été identifiés sur 30 centimètres sous la litière : un horizon supérieur foncé lié à la présence de matières organiques, et un horizon inférieur structural d'altération sur les 20 derniers centimètres (**Figure II-2**). Un mélange des deux horizons a été utilisé et ses caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le **Tableau II-1**. Cet échantillon de terre présente une texture argilo-limoneuse, une CEC élevée, contient beaucoup moins de MO et a un rapport C/N plus faible que le précédent. Le pH de cet échantillon de sol forestier est proche de la neutralité (6,6).



**Figure II-2. Profil du sol forestier de Joeuf.**

Le sol forestier (SF) a été choisi pour ses caractéristiques structurales (structure stable et bonne aération), son pH avoisinant la neutralité, son absence de carbonatation et parce qu'il présente une contamination très faible en HAP (**Tableau II-1**).

**Tableau II-1.** Caractéristiques physico-chimiques des échantillons prélevés sur le site industriel (Homécourt) et du sol forestier (Joeuf)

		<b>Homécourt</b>	<b>Joeuf</b>
<b>Granulométrie – NF X31-107</b>			
Argile (<2 µm)	%	9,2	48,2
Limons fins (2-20µm)		8,6	24,8
Limons grossiers (20-50µm)		8,8	19,6
Sables fins (50-200µm)		20,7	5,1
Sables grossiers (200-2000µm)		52,7	2,2
<b>Paramètres agronomiques</b>			
pH (eau) - NF ISO 10390		8,3	6,6
Calcaire total – NF ISO 10693	g.kg <sup>-1</sup>	135	<1
Carbone organique – NF ISO 10694		212	23
Azote total – NF ISO 13878		4,3	1,6
Rapport C/N		50,0	15,1
Matière organique	g.kg <sup>-1</sup>	366,8	39,7
$\Sigma$ 16HAP	mg.kg <sup>-1</sup>	1396,0	0,6
<b>Cations échangeables à la cobalthexamine - NF X 31-130</b>			
Ca	cmol <sup>+</sup> .kg <sup>-1</sup>	13,8	22,4
Mg		0,5	1,1
K		0,4	0,2
Na		0,03	0,09
S (cmol.kg <sup>-1</sup> )		14,7	23,8
Capacité d'échange cationique		11,2	23,6
T = S/CEC × 100	%	130	100
<b>Éléments totaux HF – NF X31-147</b>			
Cd	mg.kg <sup>-1</sup>	1,2	0,7
Cr		182,5	152,0
Co		11,2	35,9
Cu		45,6	15,3
Mo		9,65	15,3
Ni		27,2	70,9
Pb		357	54
Tl		0,2	0,7
Zn		324,3	292,0
Fe		g/100g	-
Al	-		6,2

## 2. Les dispositifs expérimentaux

Deux dispositifs expérimentaux ont été réalisés selon l'objectif recherché. Le 1<sup>er</sup> dispositif a été assemblé pour le suivi d'un HAP modèle marqué au <sup>13</sup>C, le <sup>13</sup>C-phénanthrene (<sup>13</sup>C-PHE) dans un système sol-plante (§2.1). Le second a été réalisé pour l'étude de la répartition des HAP au sein des associations organo-minérales dans un sol de friche industrielle après apport ou non d'une contamination fraîche provenant de ce même sol (§2.2)

### 2.1. Mésocosmes plantés pour le suivi d'un HAP marqué au <sup>13</sup>C

Le premier dispositif expérimental a été mis en place à partir du sol forestier contaminé artificiellement avec du <sup>13</sup>C-PHE et planté. Cette expérimentation en mésocosmes a permis de réaliser un suivi du HAP marqué dans l'ensemble du système à l'échelle globale mais aussi de suivre sa dynamique dans la rhizosphère à l'échelle micrométrique.

#### 2.1.1. Matériel biologique

**Ray-grass (*Lolium perenne*).** Au cours d'essais préliminaires afin de valider le dispositif et le protocole expérimental, deux plantes ont été testées : le ray-grass (*Lolium perenne*) et la luzerne (*Medicago sativa*). Le ray-grass et la luzerne possèdent la capacité de croître sur des sols pollués (Smith et al. 2006; Cheema et al. 2010). Ces deux plantes herbacées sont considérées comme étant de bons modèles d'étude pour la dissipation des HAP (Ghanem et al. 2010). Les résultats des essais préliminaires n'ont pas montré de différence significative dans la dégradation du PHE entre les deux plantes. Le choix a donc été fait pour le ray-grass selon des critères physiologiques et morphologiques. En effet, le ray-grass possède une exigence nutritionnelle restreinte et un système racinaire dense et fibreux. De plus, ses racines très fines permettaient de faciliter les analyses par NanoSIMS.

**Inoculum bactérien.** Un inoculum microbien a été préparé à partir du sol de friche industrielle d'Homécourt. Ce sol présente une pollution ancienne historique avec des teneurs élevées en HAP (**Tableau II-1**). Comme cela a été démontré dans des études préalables (Cerniglia, 1997; Joner et al., 2002), la microflore présente dans ces sols est ainsi adaptée à la dégradation de ce type de polluants.

La suspension a été réalisée à partir d'un mélange de 200 g de sol fraîchement prélevé (conservé à 4°C puis ré-incubé pendant 48 h à 28°C), de 1 L de solution de NaCl (0,85%) et de 30 g de billes de verres ( $\varnothing$  1 mm). Le mélange a été mis à agiter pendant minimum 1 heure à 15 rpm sur un agitateur rotatif. La solution a ensuite été laissée décanter avant l'inoculation des dispositifs expérimentaux afin d'éviter de prélever des particules de sol.

### 2.1.2. Contamination artificielle du sol forestier au $^{13}\text{C}$ -PHE

L'échantillon de sol forestier a été artificiellement contaminé par du phénanthrène marqué au  $^{13}\text{C}$  (Sigma-Aldrich Isotec Stables Isotopes, Miamisburg, Ohio, USA). Le phénanthrène est en effet couramment utilisé comme HAP modèle lors d'essais en laboratoire (Cébron et al., 2011; Richnow et al., 2000) et le composé marqué présentait l'avantage d'être marqué sur l'ensemble de ses carbones. Le  $^{13}\text{C}$ -PHE n'a pas été utilisé pur mais en mélange avec du phénanthrène non marqué (PHE, Sigma Aldrich >97%). Deux rapports de concentration  $^{13}\text{C}$ -PHE/ $^{12}\text{C}$ -PHE ont été utilisés pour contaminer le sol et réaliser l'ensemble des analyses. Le premier rapport  $^{13}\text{C}$ -PHE/PHE était de 1:8 (12,5% de  $^{13}\text{C}$ ) et a été appliqué aux échantillons dédiés aux analyses organiques et le second avec un rapport de 1:1 (50% de  $^{13}\text{C}$ ) a été utilisé pour les échantillons dédiés aux analyses par NanoSIMS. Ce dernier permet d'avoir une concentration en  $^{13}\text{C}$  plus élevée et de s'assurer d'obtenir un signal en NanoSIMS. Le sol a été contaminé à 300 mg.kg<sup>-1</sup> de PHE, et ce pour chacune des modalités. Le PHE pur ou le mélange  $^{13}\text{C}$ -PHE/ $^{12}\text{C}$ -PHE ont été dissous dans de l'hexane avant d'être ajoutés au sol. Seul 1/10<sup>ème</sup> du sol a été contaminé artificiellement par la solution de phénanthrène correspondante pour conserver la fonction biologique du sol (Binet et al., 2000a). Ensuite, le mélange est laissé sous une hotte aspirante le temps nécessaire pour que tout le solvant soit évaporé. Une fois le solvant complètement volatilisé, les 10% de sol dopé ont été mélangés au 90% de sol restant.

### 2.1.3. Montage du dispositif expérimental

Chaque dispositif a été préparé dans un bécher en verre de 6 cm de haut et de 4 cm de diamètre. L'utilisation de pots en verre a été préférée pour éviter l'adsorption du HAP sur les parois plastiques. 40 g de sol sec fraîchement contaminé ont été introduits dans chaque bécher. Pour les dispositifs plantés, 5 graines de Ray-Grass (*Lolium perenne*) ont été ajoutées aléatoirement dans le pot. Les dispositifs plantés et non plantés ont été inoculés par l'extrait

microbien (10 ml par pot) (§2.1.1), et humidifiés jusqu'à 80% de la capacité de rétention. Les pots ont été placés dans des bocaux en verre semi-clos (pour conserver un maximum d'humidité et éviter toute pollution extérieure). Les bocaux ont été disposés en chambre de culture, sous conditions contrôlées (16°C nuit/22°C jour, hygrométrie de 40%, photopériode de 16h, 250  $\mu\text{mol}$  de photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

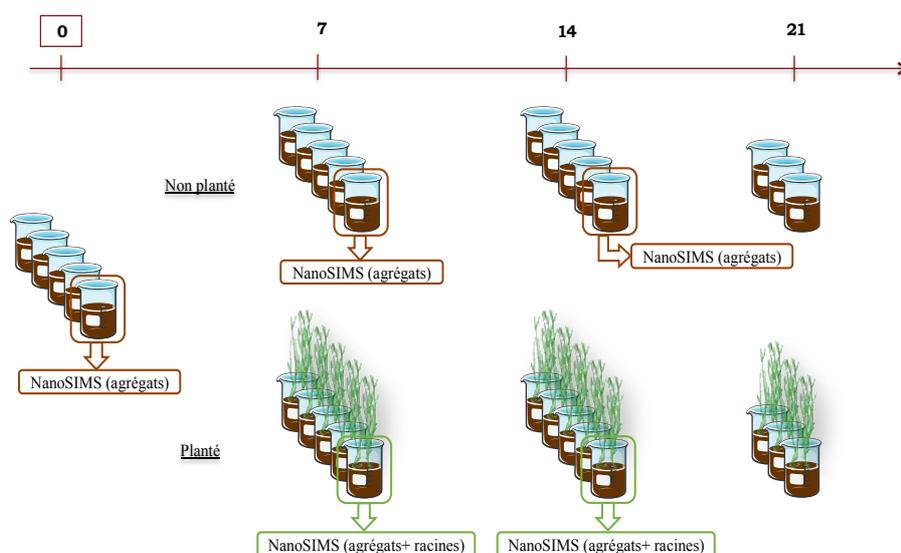
#### 2.1.4. Plan expérimental

Afin de mettre en évidence l'effet de la plante sur la dissipation du HAP, les modalités « non-planté » et « planté » ont été testées. Les dispositifs témoins (PHE non marqué) ont servi de référence, pour les valeurs d'abondance naturelle du  $^{13}\text{C}$  et permettant ainsi de discriminer le  $^{13}\text{C}$  présent naturellement du  $^{13}\text{C}$  issu du polluant.

Les quatre modalités sont les suivantes :

- Sol non-planté et contaminé artificiellement avec du PHE.
- Sol non-planté et contaminé artificiellement avec du  $^{13}\text{C}$ -PHE.
- Sol planté contaminé artificiellement avec une solution de PHE.
- Sol planté et contaminé artificiellement au  $^{13}\text{C}$ -PHE.

L'expérience a été réalisée sur une durée de 21 jours avec un échantillonnage à T0, puis hebdomadaire à 7, 14 et 21 jours par sacrifice de l'ensemble des replicats. Les pots témoins et enrichis sont répliqués 4 fois (**Figure II-3**) excepté à 21 jours où le nombre de replicats a été réduit à 3, et un réplikat additionnel a été ajouté au plan expérimental à 0, 7 et 14 jours. Les replicats additionnels ont été réalisés pour effectuer les analyses en NanoSIMS.



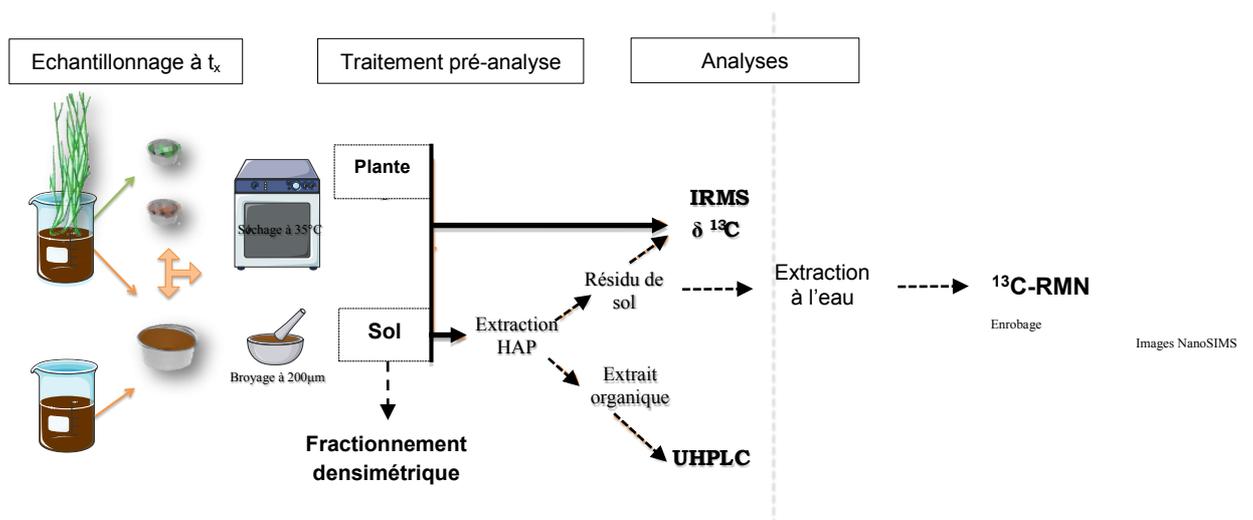
**Figure II-3.** Schéma général du plan expérimental de l'étude pour les dispositifs marqués au  $^{13}\text{C}$ -PHE

### 2.1.5. Méthode d'échantillonnage

Lors des différents prélèvements, pour les dispositifs plantés : le sol et la biomasse végétale ont été récoltés indépendamment (**Figure II-4**).

**Echantillonnage du sol.** A chaque temps de mesure et pour chaque pot, le sol a été prélevé en totalité, pesé, séché à l'étuve à 35°C pendant 24h et pesé de nouveau pour déterminer la masse sèche. Le sol sec a été homogénéisé par broyage et tamisage à 200 µm. Les échantillons de sol ont été conditionnés dans des flacons en plastique, à l'obscurité et à température ambiante. Cependant, un aliquot de sol frais (~2 g par échantillon) a été conservé pour les analyses moléculaires et conservé à -80°C.

**Echantillonnage de la biomasse végétale.** Pour chaque temps d'échantillonnage et pour chaque dispositif planté, les parties aériennes de la plante ont été coupées, mesurées, pesées (masse humide) puis séchées à l'étuve (35°C). Les racines ont été séparées du sol, agitées pour déloger l'excès de sol adhérent et rincées dans des tubes Falcon contenant de l'eau distillée. L'excès d'eau a ensuite été absorbé à l'aide d'un papier buvard et les racines ont été pesées humides. Les tubes (Falcon) contenant l'eau de rinçage des racines ont été centrifugés puis conservés à -20°C. Les racines et parties aériennes humides ont été pesées séparément et mises à l'étuve à 35°C pendant 24h minimum. Une fois séchés, les tissus végétaux ont été pesés et conservés dans des flacons en verre.



**Figure II-4.** Echantillonnage du sol et de la biomasse végétale lors de l'expérimentation avec du <sup>13</sup>C-PHE pour les analyses organiques

## 2.2. Mésocosmes de sol industriel historiquement contaminé avec apport ou non d'une contamination fraîche

L'objectif de la deuxième expérimentation a été d'étudier l'influence des complexes organo-minéraux sur la dynamique des HAP. Pour cela, le sol prélevé sur la friche industrielle d'Homécourt a été contaminé artificiellement ou non par un extrait organique provenant de ce même sol afin d'apporter une pollution fraîche et disponible (Bourceret et al., 2015).

### 2.2.1. Montage des dispositifs expérimentaux.

Le sol industriel d'Homécourt a été tamisé à 2 mm et 100 g de sol sec ont été introduits dans des flacons en verre de 250 mL. Deux conditions ont été testées : (i) le sol comportant une pollution historique a été gardé brut (HOM) et (ii) a été fraîchement contaminé à partir d'un extrait organique obtenu après extraction au dichlorométhane (DCM) de ce même sol (HOM<sub>+HAP</sub>).

**Contamination artificielle du sol HOM.** La contamination du sol HOM a été réalisée après extraction par ASE au DCM des polluants organiques de ce même sol. Le protocole d'extraction est détaillé plus loin (§3.1): 36 g de sol sec et broyé ont été extraits afin de contaminer le sol à 500 mg.kg<sup>-1</sup>. La procédure de dopage est équivalente à celle utilisée lors de la contamination du sol forestier par le PHE (§2.1.2). Seul 1/10<sup>ème</sup> du sol a été contaminé par l'extrait organique solubilisé dans le DCM. L'extrait a été ajouté progressivement aux 10 g de sol, l'ensemble a été homogénéisé et le solvant a été évaporé sous une hotte aspirante. Une fois l'extrait entièrement ajouté et le solvant complètement évaporé (il ne doit rester aucune trace de DCM), les 1/10<sup>ème</sup> de sol recontaminé sont mélangés au 9/10<sup>ème</sup> restant. Les teneurs en HAP ont été dosées juste après la recontamination, et après les 15 jours de stabilisation (**Figure II-5**).

### 2.2.2. Stabilisation de la contamination.

Les échantillons de sol HOM et HOM<sub>+HAP</sub> préalablement réhumidifiés à 80% de leur capacité au champ, ont été mis à stabiliser dans des flacons en verre (recouverts de papier aluminium) pendant 15 jours en chambre froide (4°C). Quelle que soit la condition, les sols ont été mis à stabiliser afin d'être dans les mêmes conditions expérimentales (**Figure II-5**). Le dosage des

16 HAP a été effectué à T0 (avant stabilisation) et à T15 (après la phase de stabilisation) pour les deux sols. Les échantillons de sol HOM et HOM<sub>+HAP</sub> ont ensuite été fractionnés selon le protocole de séparation densimétrique décrit dans le point 3.2.

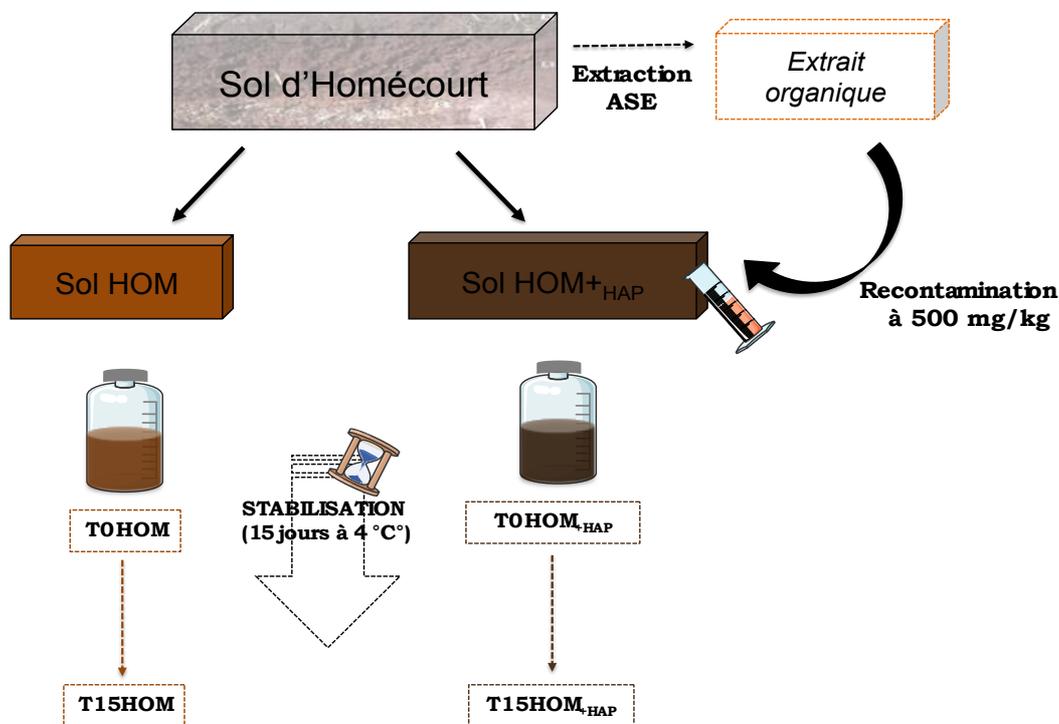


Figure II-5. Stabilisation des sols HOM et HOM<sub>+HAP</sub>

Après la phase de stabilisation (T15) les échantillons de sol HOM et HOM<sub>+HAP</sub> ont été répartis dans quatre tubes à centrifugation en polycarbonate. Ces 4 replicats de sol (~10 g), pour chaque modalité, ont été fractionnés selon la même procédure (§3.2.2).

### 3. Traitements des échantillons et analyses

#### 3.1. Extraction accélérée par solvant (ASE)

Les conditions d'extraction par ASE des composés organiques par le dichlorométhane (DCM) (§3.1.1) ou l'eau ultrapure (§3.1.2) sont données dans le **Tableau II-2**.

**Tableau II-2.** Conditions d'extraction des composés organiques au DCM et à l'eau ultrapure

<b>Conditions d'extraction</b>	
<b>Température du four</b>	130°C ou 100°C
<b>Pression</b>	100 bars
<b>Préchauffage</b>	7 min
<b>Extraction (static time)</b>	5 min
<b>Cycle</b>	2
<b>Volume de rinçage</b>	60%
<b>Solvant d'extraction</b>	MeCl <sub>2</sub> ou H <sub>2</sub> O
<b>Type de cellule</b>	SST : Inox

### 3.1.1. Extraction des HAP au dichlorométhane (DCM).

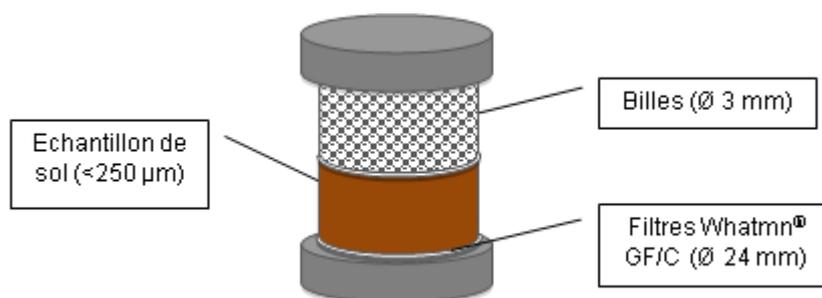
Les HAP totaux ont été extraits des échantillons de sol à l'aide d'un extracteur Dionex ASE (Accelerated Solvent Extractor). L'ASE<sup>®</sup> est une technique d'extraction rapide et automatisée permettant d'extraire les composés organiques issus d'échantillons solides variés. L'extraction se fait à haute température et à pression élevée et nécessite l'utilisation d'un solvant. Pour l'extraction de composés tels que les HAP, le solvant organique qui est utilisé est le DCM et va favoriser la solubilisation des analytes<sup>1</sup> de par ses propriétés lipophiles. L'ASE fait partie des techniques d'extraction des HAP présentant les meilleurs rendements, et étant la moins chronophage (Berset et al., 1999; Wang et al., 2007).

Pour les sols d'Homécourt et Joeuf une méthode classique d'extraction au DCM a été utilisée, les conditions sont résumées dans le **Tableau II-2**.

Deux grammes d'échantillon de sol sec et broyé à 250 µm ont été pesés et mélangés à 1 g de terre de diatomées (agent desséchant, Sigma-Aldrich). En revanche, la terre de diatomées n'a pas été utilisée lorsque les résidus d'extraction ont dû être récupérés pour être analysés. L'échantillon a été introduit dans une cellule en inox de 11 mL entre deux filtres en

<sup>1</sup> La solubilité dans un solvant augmente avec la température et celle-ci permet au solvant de pénétrer plus facilement dans les pores de la matrice et donc d'avoir un taux de diffusion rapide.

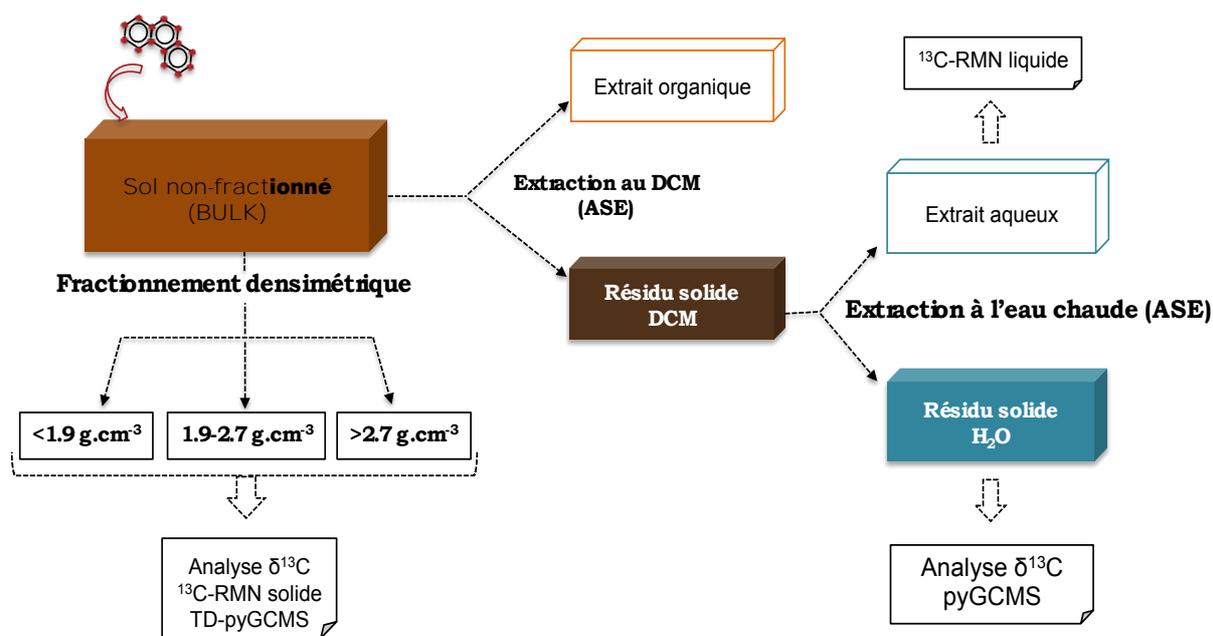
microfibres de verre (GF/C, Whatman®). Le volume restant a été comblé par des billes de verre (3 mm de diamètre) (**Figure II-6**). L'extraction ASE est effectuée sous haute température et sous haute pression. Les extraits organiques au DCM ont été récupérés dans des flacons opaques. Un changement de solvant a été effectué sur les extraits DCM avant l'analyse des 16 HAP totaux en UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography). Le solvant d'extraction a été remplacé par de l'acétonitrile (ACN), solvant utilisé dans la phase mobile (éluant) en UHPLC.



**Figure II-6.** Schéma du remplissage des cellules ASE

### 3.1.2. Extraction des composés organiques à l'eau ultra-pure.

Pour les échantillons du sol de Joeuf, une première extraction au DCM a été réalisée et produit d'une part un extrait organique (extrait DCM) et de l'autre un résidu solide (résidu DCM) (**Figure II-7**). Une seconde extraction a été appliquée sur les résidus DCM qui ont été réextraits selon la même procédure mais en utilisant de l'eau ultrapure comme solvant. L'extraction de la MO hydrosoluble à partir du résidu DCM a été réalisée à haute température (100°C) et à haute pression (100 bars). Le protocole appliqué est adapté des travaux de Guigue et al. (2014). Les extraits aqueux ainsi obtenus ont été lyophilisés, solubilisés dans de l'eau deutérée et analysés en  $^{13}\text{C}$ -RMN liquide.



**Figure II-7.** Schéma des traitements physiques, chimiques et techniques analytiques utilisés sur les échantillons de sol lors de l'expérimentation avec du <sup>13</sup>C-PHE

### 3.2. Fractionnement densimétrique

Le fractionnement densimétrique a été appliqué sur les deux sols étudiés en utilisant la même procédure, mais dans deux buts distincts. Les séparations par densimétrie ont été réalisées sur :

- ☑ Le **sol forestier** afin d'isoler les oxydes et hydroxydes de fer dans la fraction la plus dense (>2.7) et d'analyser les autres fractions produites en <sup>13</sup>C-RMN solide (**Figure II-7**). Les analyses n'ont pas pu être effectuées sur le sol brut (trop riche en fer) et ont nécessité un prétraitement. En effet, le sol contient des teneurs en fer trop élevées (11% de fer total) pour pouvoir être analysé directement en résonance magnétique nucléaire. Les ions paramagnétiques de Fe possèdent des propriétés perturbant le signal lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique, et produisent des spectres non exploitables. L'objectif a donc été d'écarter les oxyhydroxydes de fer prédominants dans la fraction > à 2.7 pour les séparer des autres phases majoritaires du sol (quartz, feldspaths, argiles). Les fractions densimétriques obtenues sont données dans la **Figure II-8**. Seule la fraction légère constituée de MO libre (<1.9) et les complexes organo-minéraux formant la fraction 1.9-2.7 ont été analysés en RMN du <sup>13</sup>C.
- ☑ Le **sol industriel**, dans le but cette fois d'étudier la répartition des HAP au sein des différents complexes organo-minéraux présents dans ce sol.

Pour réaliser le fractionnement par densimétrie, la première étape a consisté à définir les différents paramètres en fonction de l'objectif de l'expérimentation et de la nature du sol utilisé.

**3.2.1. Choix des coupures**

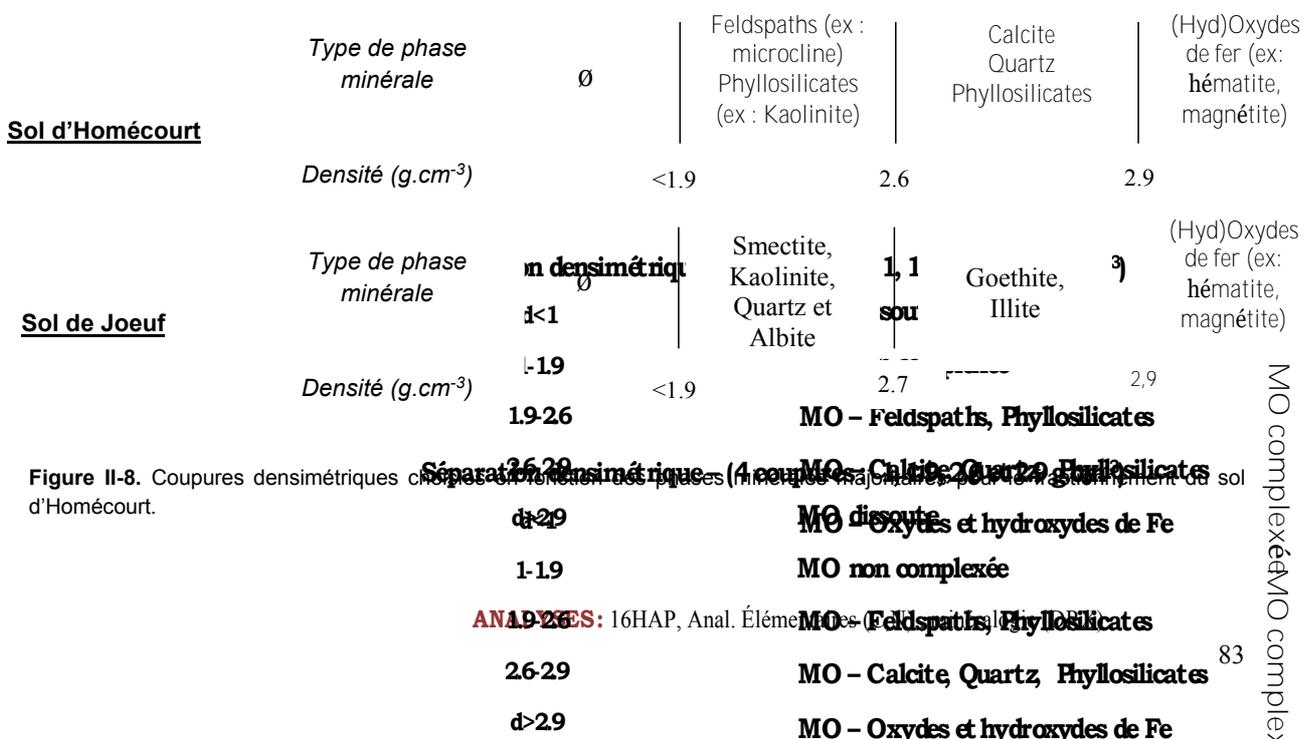
Le choix des coupures a été fait en fonction des phases minérales majoritaires présentes dans les sols non fractionnés d'Homécourt et de Joeuf (**Tableau II-3**).

**Choix des coupures densimétriques.** Les différents types de complexes organo-minéraux ont été séparés en fonction de la densité des minéraux. A partir des analyses en diffraction des rayons X (§3.3), les phases minérales dominantes ont pu être identifiées (**Tableau II-3**).

**Tableau II-3.** Phases minérales dominantes associées à la minéralogie du sol (a) d'Homécourt et (b) de Joeuf.

Minéraux	Formule chimique	Densité	Homécourt	Joeuf
Quartz	SiO <sub>2</sub>	2.65	✓	✓
Calcite	CaCO <sub>3</sub>	2.6 à 2.8	✓	✗
Microcline	KAlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	2.54 à 2.57	✓	✗
Albite	NaAlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	2,6	✗	✓
Kaolinite	Al <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub>	2.6	✓	✓
Illite	(K,H <sub>3</sub> O)(Al,Mg,Fe) <sub>2</sub> (Si,Al) <sub>4</sub> O <sub>10</sub> [(OH) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)]	2.79-2.8	✗	✓
Smectite	(Na,Ca) <sub>0,3</sub> (Al, Mg) <sub>2</sub> Si <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub> .nH <sub>2</sub> O	2 à 2.7	✗	✓
Goethite	FeO(OH)	4.3	✗	✓
Hématite	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5.26	✓	✗
Magnétite	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	5.17 à 5.18	✓	✗

Les phases minérales majoritaires qui ont été identifiées dans le sol d'Homécourt et de Joeuf sont listées dans le **Tableau II-3**, associées de leur densité respective.



Le choix des coupures a été effectué suite à des analyses minéralogiques (DRX) réalisées pour la terre globale. Les phases minérales majoritaires observées dans le sol d'Homécourt et de Joeuf (**Tableau II-3**) ont permis de définir les coupures densimétriques à choisir pour réaliser le fractionnement à 1.0, 1.9, 2.6 et 2.9 g.cm<sup>-3</sup> et à 1.0, 1.9 et 2.7 respectivement. Les différentes densités choisies ont permis d'obtenir des fractions densimétriques aux caractéristiques minéralogiques et élémentaires propres (**Figure II-8**). La première coupure a été effectuée à la densité 1.9 dans le but de séparer la MO non-complexée (fraction légère, <1.9) des complexes organo-minéraux (fraction dense, >1.9).

Une solution de **métatungstate de sodium de formule Na<sub>6</sub>[H<sub>2</sub>W<sub>12</sub>O<sub>40</sub>]** a été utilisée pour le fractionnement. Ce produit présente l'avantage de bien se solubiliser dans l'eau, et possède une gamme d'utilisation large allant de 1.1 à 3.0 g.cm<sup>-3</sup>.

A partir des différentes équations données en **Annexe II-1**, pour chacune des densités utilisées et pour chaque taille de particules, la vitesse et le temps de sédimentation ont été calculés. Les temps de centrifugation ont été estimés pour chaque densité de solution de métatungstate de sodium (**Tableau II-4**). Les temps de sédimentation sont d'autant plus élevés que la taille des particules est réduite et une forte densité de fluide est un frein au dépôt. En conséquence, pour les séparations à faible densité (1 et 1.9), des centrifugations de 70 minutes ont permis de faire sédimenter les particules fines. Une centrifugation trop longue aurait pu rendre le culot plus difficile à casser pour les séparations suivantes et engendrer des pertes de matières, déjà importantes lors de ce type de procédure.

Pour les densités 2.6 (ou 2.7) et 2.9, afin d'éviter des temps de centrifugation conséquents et non réalisables en pratique, des temps de 110 min et 210 min ont été choisis respectivement. Ces derniers ne permettent cependant pas de faire sédimenter des particules aussi fines que pour les deux premières séparations.

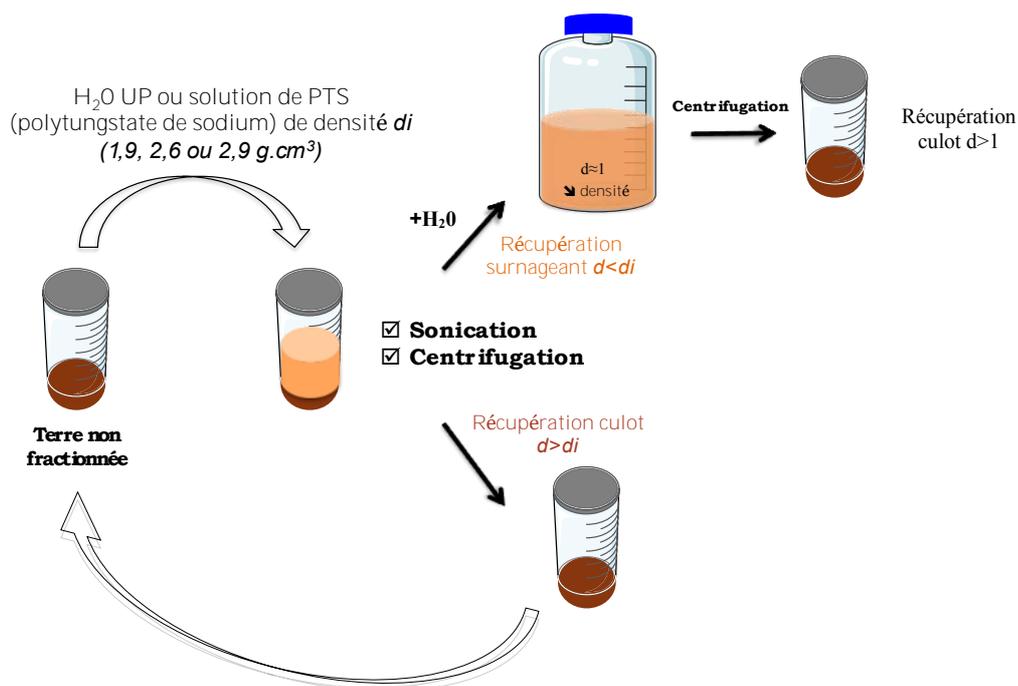
Tableau II-4. Estimation des temps de centrifugation pour chaque densité de solution.

Densité de la solution (g/cm <sup>3</sup> )	Taille des particules (µm)	Vitesse de sédimentation (cm/min)	Temps de sédimentation (min)	Temps choisi pour les centrifugations (min)
<b>1</b>	0,2	5,78E-02	138,3	<b>70</b>
	0,5	3,62E-01	22,1	
	0,8	9,25E-01	8,6	
	1	1,45E+00	5,5	
	1,5	3,25E+00	2,5	
	2	5,78E+00	1,4	
<b>1,9</b>	0,2	2,89E-02	224,7	<b>70</b>
	0,5	1,81E-01	36,0	
	0,8	4,63E-01	14,0	
	1	7,23E-01	9,0	
	1,5	1,63E+00	4,0	
	2	2,89E+00	2,2	
<b>2,6</b>	0,2	5,78E-03	1123,7	<b>120</b>
	0,5	3,62E-02	179,8	
	0,8	9,25E-02	70,2	
	1	1,45E-01	44,9	
	1,5	3,25E-01	20,0	
	2	5,78E-01	11,2	
<b>2,9</b>	0,2	2,22E-03	2921,7	<b>210</b>
	0,5	1,39E-02	467,5	
	0,8	3,56E-02	182,6	
	1	5,56E-02	116,9	
	1,5	1,25E-01	51,9	
	2	2,22E-01	29,2	

### 3.2.2. Protocole expérimental

Le protocole de séparation densimétrique est adapté des travaux de Basile-Doelsch et al. (2007) & de Junet et al. (2013). La méthodologie est uniquement détaillée ici pour le sol d'Homécourt, la procédure appliquée au sol forestier de Joeuf étant identique. Hormis le choix des coupures et le nombre de fractions produites, les étapes de fractionnement ont été les mêmes. De plus, les résultats obtenus à l'issue des séparations ont été exprimés de la même façon (§3.2.3) que ce soit pour le fractionnement du sol forestier ou du sol de cokerie.

*Protocole opératoire.* Différentes solutions de métatungstate de sodium de densité de 1,9, 2,6 et 2,9 g.cm<sup>-3</sup> ont été préparées à partir d'eau ultrapure. Le protocole expérimental utilisé est détaillé ci-dessous et schématisé (**Figure II-9**).



**Figure II-9.** Schéma du protocole expérimental de séparation densimétrique.

Pour chaque réplicat, 10 g de sol frais ont été introduits dans un tube à centrifugation en polycarbonate de 80 mL et mélangés à de l'eau ultra pure. Après agitation, la suspension de sol a fait l'objet d'un traitement aux ultrasons (sonicateur à sonde de haute intensité {750W}) avec une énergie de 730 J.g<sup>-1</sup> de sol. Le traitement par ultrasons consiste à disperser les macroagrégats présents dans le sol. La solution de sol obtenue a été centrifugée pendant 70 minutes à 10000 rpm. Le surnageant contenant les particules de densité  $d < 1$  a été récupéré (**Figure II-9**) dans des tubes de 50 mL (Falcon), et congelé à -20°C. Cette étape a été réalisée deux fois selon une procédure identique. Le culot  $d > 1$  a été cassé et mélangé à la solution de métatungstate de sodium de densité 1.9 g.cm<sup>-3</sup>. Le mélange a été soumis à une sonication avec une énergie de 130 J.g<sup>-1</sup> de sol, puis centrifugé pendant 70 minutes à 10000 rpm. Le surnageant a été récupéré dans un flacon en verre de 1 L, la densité est diminuée à  $\approx 1$  g.cm<sup>-3</sup> après ajout d'environ 800 mL d'eau ultra pure. Cette étape a permis de récupérer les particules de sol constituant la fraction 1-1.9 g.cm<sup>-3</sup>. Le surnageant a ensuite été transféré dans de nouveaux tubes à centrifuger, et les particules de densité comprise entre 1 et 1.9 g.cm<sup>-3</sup> ont été récupérées par centrifugation (60 minutes à 10000 rpm). Le culot de densité  $d > 1.9$  a été cassé à l'aide d'une spatule en inox, et la solution de métatungstate de sodium de densité 2.6 g.cm<sup>-3</sup> a été ajoutée. La suspension de sol a été sonifiée avec une énergie de 130 J.g<sup>-1</sup> de sol, et centrifugée pendant 110 minutes à 10000 rpm. Le surnageant de densité  $d < 2.6$  g.cm<sup>-3</sup> a été

recupéré dans un flacon en verre de 500 mL, la densité a été abaissée à environ 1 g.cm<sup>-3</sup> après addition d'eau (>250 mL). La solution a été transférée dans de nouveaux tubes à centrifuger, et les particules de sol de densité comprise entre 1.9 et 2.6 g.cm<sup>-3</sup> ont été récupérées après centrifugation à 10000 rpm pendant 60 minutes. Le culot de densité  $d > 2.6$  g.cm<sup>-3</sup> a été cassé, et la solution de métatungstate de densité 2.9 g.cm<sup>-3</sup> a été ajoutée. Le mélange a été soumis à une sonication avec une énergie de 130 J.g<sup>-1</sup> de sol, puis centrifugé pendant 180 minutes à 10000 rpm. Le surnageant de densité  $d < 2.9$  g.cm<sup>-3</sup> a été récupéré, la densité baissée comme précédemment, et les particules de densité comprise entre 2.6 et 2.9 g.cm<sup>-3</sup> ont été culotées après transfert de la solution dans de nouveaux tubes en PC.

Toutes les fractions densimétriques ont été récupérées sous la forme d'un culot. Chaque culot a été rincé (à l'eau ultrapure) pour retirer toutes traces de polytungstate avant d'être congelé (-20°C) puis lyophilisé. Les échantillons lyophilisés ont été pesés puis broyés avant d'être analysés.

Chaque fraction densimétrique produite a été analysée à l'UHPLC pour le dosage des HAP (§3.6.3), le carbone et l'azote ont été mesurés par un analyseur élémentaire (CHN) (§3.6.1) et les phases minérales ont été identifiées par diffraction des rayons X (§3.3)

### 3.2.3. Expression des résultats

La proportion massique (%<sub>massique</sub>) pour chaque fraction a été obtenue par le calcul suivant :

$$\%_{\text{massique}} = \left( \frac{m_{\text{fraction}}}{m_{\text{total}}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Où  $m_{\text{fraction}}$  correspond à la masse de la fraction (exprimée en gramme de fraction) et  $m_{\text{total}}$  correspond à la masse totale de sol utilisé pour le fractionnement densimétrique.

La différence entre la  $m_{\text{total}}$  et la somme des  $m_{\text{fraction}}$  correspond à la perte en masse ayant eu lieu pendant la séparation par densimétrique.

Chaque valeur de concentration obtenue par le dosage des HAP, du carbone ou de l'azote pour chacune des fractions densimétriques est exprimée en mg.kg<sup>-1</sup> et mg.g<sup>-1</sup> de fraction respectivement. Les concentrations ont été déterminées en mg.kg<sup>-1</sup> de sol sec pour les HAP et mg.g<sup>-1</sup> de sol sec pour le carbone organique (COT) et l'azote total (N).

Les teneurs en HAP, en C et N dans chacune des fractions ont été exprimées en mg.kg<sup>-1</sup> et mg.g<sup>-1</sup> de sol sec selon la formule suivante:

$$[X]_{sol} = \frac{[X]_{fraction}}{100} \times \%_{massique} \quad \text{Eq. 2}$$

Où  $[X]_{fraction}$  correspond aux teneurs ( $X = \text{HAP, COT ou N}$ ) exprimées en  $\text{mg.kg}^{-1}$  et  $\text{mg.g}^{-1}$  de fraction et  $[X]_{sol}$  correspond aux teneurs ( $X = \text{HAP, COT ou N}$ ) exprimées en  $\text{mg.kg}^{-1}$  et  $\text{mg.g}^{-1}$  de sol sec.

La proportion en éléments  $X = \text{HAP, COT ou N}$ , a pu être déterminée de la façon suivante :

$$\% X_{fraction} = \frac{X_{fraction}}{X_{total}} \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

Où  $X_{fraction}$  correspond aux teneurs en élément  $X$  dans la fraction, exprimées en  $\text{mg.kg}^{-1}$  et  $\text{mg.g}^{-1}$  de sol sec. Le  $X_{total}$  correspond aux teneurs en élément  $X$  dans le sol non fractionné, et exprimées en  $\text{mg.kg}^{-1}$  et  $\text{mg.g}^{-1}$  de sol sec. Enfin,  $\% X_{fraction}$  correspond à la proportion d'élément  $X$  qui est retrouvée dans la fraction densimétrique correspondante.

### 3.3. Analyses minéralogiques par diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X (DRX) permet d'identifier les phases minérales majeures d'un échantillon de sol. Elle a été utilisée pour les deux sols étudiés, sur le sol brut et les fractions densimétriques. Les mesures ont été effectuées sur un diffractomètre D8-Discover Bruker avec une anode au cobalt possédant une longueur d'onde  $\lambda_{\text{CoK}\alpha}$  de  $1,789\text{\AA}$ . Le détecteur est un détecteur linéaire. La puissance du générateur est fixée à 35 kV et 45 mA. Le domaine de mesure en  $2\theta$  est de  $3^\circ$ - $64^\circ$  avec un pas de  $0.03^\circ$  et une durée d'acquisition par point de 3 secondes. Les pics de diffraction ont été identifiés à l'aide du logiciel EVA (Bruker) qui possède une base de données importante pour l'analyse des données DRX. Toutes les analyses de DRX ont été réalisées au LIEC avec la collaboration de Renaud Gley et Isabelle Bihannic. Cette technique d'analyse semi-quantitative, ne permet pas d'observer les phases amorphes ou très mal cristallisées.

### 3.4. Mesure des surfaces spécifiques par la méthode BET

Les mesures de surfaces spécifiques ont été réalisées par la méthode au BET (norme AFNOR NF X 11-621). Cette méthode consiste à modéliser la portion de l'isotherme qui correspond à la fin de l'adsorption de la première couche de gaz ( $0,05 < P/P_0 < 0,2$ ) par une isotherme théorique d'adsorption multicouche proposée par Brunauer, et al. (1938). Les mesures ont été effectuées sur un absorbomètre automatique Belsorp-mini II de BELJAPAN, Inc. Il est équipé d'un groupe de pompage turbomoléculaire qui assure un vide limite de 0,01 Pa. Les cellules contenant les échantillons à analyser sont dotées chacune d'un capteur assurant la mesure de pression dans la gamme 0-133 kPa. L'appareillage permet la réalisation d'une isotherme d'adsorption/désorption d'azote point par point, par introductions successives (ou pompage) d'azote à 77K dans le domaine de pressions relatives 0-0.98. La surface spécifique à l'azote est déterminée en considérant l'encombrement de l'azote à  $16.4\text{\AA}^2$ , soit  $S = 4.37 \times V_m$ . L'erreur expérimentale est estimée respectivement à environ  $0.50 \text{ m}^2$  à répartir sur 1 gramme de masse d'échantillon utilisée pour les mesures à l'azote. Le test régulier effectué sur l'appareil Belsorp-mini II avec l'échantillon de référence (TiO<sub>2</sub> fourni par « Community Bureau of Reference » de surface spécifique  $8.23 \pm 0.21 \text{ m}^2/\text{g}$ ) donne un écart de moins de 5% par rapport à la valeur admise.

Ces analyses ont été réalisées par Angelina Razafitianamaharavo au LIEC (Charmois).

### 3.5. Analyses microbiologiques

#### 3.5.1. Nombre le plus probable (NPP) de microorganismes

Un dénombrement (NPP) a été réalisé pour estimer la microflore totale du sol forestier selon la procédure détaillée dans l'**Annexe II-2**. A partir des résultats obtenus, le volume d'inoculation a pu être estimé.

#### 3.5.2. Extraction d'ADN

Une partie des échantillons de sol témoins et enrichis en <sup>13</sup>C récoltés à 7, 14 et 21 jours ont été aliquotés et conservés à -80°C.

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir du kit d'extraction FastDNA™ SPIN Kit pour sol selon les instructions du fournisseur. 500 mg de sol (sec ou congelé) ont été aliquotés

et introduits dans un tube Lysing Matrix E. 978  $\mu\text{L}$  de tampon de phosphate et 122  $\mu\text{L}$  de tampon MT ont été ajoutés au sol. Les échantillons ont ensuite été homogénéisés à l'aide d'un appareil FastPrep pendant 40 secondes. Cette étape a permis la lyse des cellules, les débris cellulaires ont été récupérés après une centrifugation de 10 minutes à 14000g dans le culot. Le surnageant a été récupéré et transféré dans un tube propre. 250  $\mu\text{L}$  de solution pour précipitation des protéines ont été mélangés avec le surnageant. Le mélange a été agité 10 fois par inversion puis centrifugé pendant 5 minutes à 14000g. Les protéines ont été précipitées dans le fond du tube (culot). Le surnageant a été transféré dans un tube de 15 mL et mélangé à 1 mL de matrice à base de silice de fixation de l'ADN. Le mélange a été agité par rotation pendant 2 minutes puis décanté pendant 5 minutes. 500  $\mu\text{L}$  de surnageant ont été prélevés en évitant de toucher la matrice qui est ensuite remise en suspension avec le volume de surnageant restant. Le mélange (600 $\mu\text{L}$ ) a été filtré sur une colonne SPIN<sup>TM</sup> Filter puis mis à centrifuger pendant 1 minute à 13000g. L'éluat a été éliminé, le restant de matrice mis en suspension a été transféré et l'étape répétée. 500  $\mu\text{L}$  de tampon SEWS-M ont été ajoutés et la matrice mise en suspension par aspiration/refoulement en évitant de toucher le filtre. La suspension a été centrifugée à 13000g pendant 1 minute et l'éluat éliminé. La colonne a été placée dans un nouveau tube et mise à sécher à température ambiante pendant 5 minutes. La matrice a été pour finir mise en suspension dans 100  $\mu\text{L}$  de DES (DNase Pyrogen/Free Water) et le mélange a été centrifugé. Les extraits d'ADN ont été aliquotés, en partie, afin d'être quantifiés et le reste a été conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les extraits ont ensuite été lyophilisés et analysés en IRMS à l'INRA de Champenoux. Malgré les quantités très faibles d'ADN extraits, les rapports isotopiques ont pu être mesurés pour chacun des échantillons.

### 3.6. Analyses organiques

#### 3.6.1. Analyses élémentaires par CHN

Le carbone ( $C_T$ ) et l'azote (N) total ont été dosés dans le sol brut, le sol résiduel, les fractions densimétriques et la biomasse végétale (racine et partie aérienne) par un analyseur élémentaire (EA/IRMS Elementary analyzer – Isotope Ratio Mass Spectrometry 100, IsoPrime, Manchester. EA : IsotopeCube, Elementar, Hanau) à la Plateforme Technique d'Ecologie Fonctionnelle (PTEF) du centre INRA de Champenoux à la suite de l'expérimentation avec le  $^{13}\text{C}$ -PHE. Pour les échantillons de sol (brut et fractions

densimétriques) issus de l'expérimentation avec le sol HOM, l'analyse a été réalisée à l'aide d'un analyseur élémentaire CHNS (ThermoFischerScientifique) au LIEC.

Entre 1 et 15 mg d'échantillon réduit à l'état de poudre ont été pesés dans des nacelles en étain de dimension 6x4 mm (Elemental Microanalysis Limited, Devon, UK). Les nacelles ont été introduites dans l'analyseur pour subir une combustion flash (1000°C) avec apport d'oxygène (en excès pour que la combustion soit totale). La formation de gaz élémentaires (CO<sub>2</sub> pour le C, N<sub>2</sub> pour l'N) résulte de la combustion. Les gaz produits sont transportés par un gaz vecteur (l'hélium), sont séparés par chromatographie et quantifiés par un détecteur (**Figure II-10**).

Pour réaliser les mesures du carbone organique total (COT) des fractions densimétriques, les échantillons ont été préalablement traités à l'aide d'une solution d'HCl (4M) ajoutée en excès sur la prise d'essai dans le but d'éliminer la totalité des carbonates présents. Après un séchage sous hotte (>48h, à température ambiante) des sols, l'analyse par CHN a pu être effectuée.

### 3.6.2. Analyses isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ par IRMS

L'abondance isotopique en <sup>13</sup>C (atom%) des échantillons de sol, de végétaux et d'ADN a été déterminée par un analyseur de gaz couplé à un spectromètre de mesure isotopique (EA-GC/IRMS Elementary analyzer – Isotope Ratio Mass Spectrometry 100, IsoPrime, Manchester. EA : IsotopeCube, Elementar, Hanau). Quelques milligrammes d'échantillon (sol ou tissu végétal) ont été pesés dans des nacelles en étain. Concernant les échantillons d'ADN, les extraits obtenus (3.5.2) ont été introduits dans les nacelles et lyophilisés.

Par un processus de combustion, le spectromètre de masse à rapports isotopiques (IRMS) permet de convertir le carbone et l'azote présents dans les échantillons en CO<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>. Les gaz produits dans l'analyseur élémentaire sont envoyés vers le spectromètre de masse à ratio isotopique (**Figure II-10**). Ainsi, les rapports des isotopes stables du C ( $\delta^{13}\text{C}$ ) ont pu être mesurés. Les analyses ont été réalisées simultanément pour le dosage du carbone et de l'azote à la PTEF (OC 081) de l'INRA Champenoux dans l'unité d'Ecologie et d'Eco-physiologie.

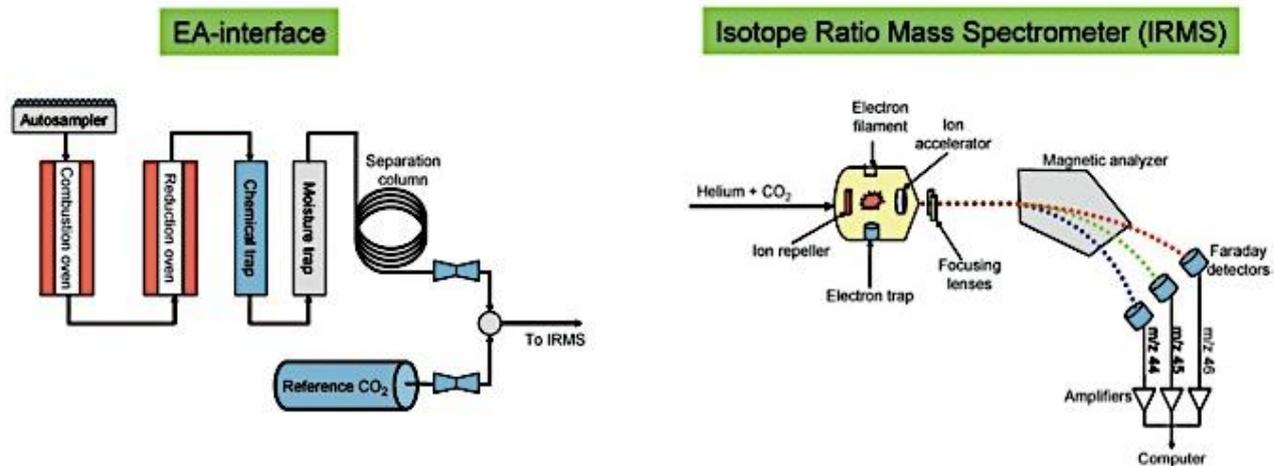


Figure II-10. Schéma d'un analyseur élémentaire et d'un spectromètre de masse à ratio isotopique (Muccio & Jackson, 2008)

Le signal  $\delta^{13}\text{C}$  mesuré a permis de calculer le rapport isotopique de chaque échantillon (témoin et enrichi), mais aussi l'abondance en  $^{13}\text{C}$  dans les échantillons enrichis au  $^{13}\text{C}$ -PHE. Le rapport isotopique ( $R^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) de l'échantillon a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$R_{\text{échantillon}} = ((\delta^{13}\text{C}/1000) + 1) * R_{\text{PDB}} \quad \text{Eq. 4}$$

Où  $R_{\text{échantillon}} = ^{13}\text{C}_{\text{échantillon}}/^{12}\text{C}_{\text{échantillon}}$  dans les échantillons témoins et enrichis, et  $R_{\text{PDB}} = ^{13}\text{C}_{\text{PDB}}/^{12}\text{C}_{\text{PDB}} = 0,0112372$  qui est la valeur standard internationale de l'abondance en  $^{13}\text{C}$  de la Vienna Pee Dee Bélemnite (VPDB) correspondant à  $\delta^{13}\text{C}$  de 0 ‰.

L'enrichissement en carbone isotopique a été calculé par rapport aux valeurs mesurées dans les échantillons contrôles ( $^{12}\text{C}$ -PHE) dans le sol et la plante comme suit :

$$E^{13}\text{C} = (^{13}\text{C}_{\text{enrichi}} - ^{13}\text{C}_{\text{control}}) (\%) \quad \text{Eq. 5}$$

Où  $^{13}\text{C}_{\text{enrichi}} (\text{atom}\%) = [R_{\text{enrichi}} / (R_{\text{enrichi}} + 1)] \times 100$ , et  $^{13}\text{C}_{\text{control}} (\text{atom}\%) = [R_{\text{control}} / (R_{\text{control}} + 1)] \times 100$ . L'enrichissement en  $^{13}\text{C}$  ( $E^{13}\text{C}$ ) a été calculé pour le sol brut, le résidu, les fractions densimétriques et la plante (racines et parties aériennes).

Les concentrations en  $^{13}\text{C}$  ont également été calculées à partir des abondances isotopiques mesurées dans les échantillons enrichis (comparé au  $^{13}\text{C}$  retrouvé en abondance naturelle, et mesuré dans l'échantillon non marqué correspondant), et à partir des teneurs en

carbone. Au temps T0, après ajout du HAP modèle ( $^{12}\text{C}$ -PHE et  $^{12}\text{C}$ -PHE/ $^{13}\text{C}$ -PHE), la concentration en  $^{13}\text{C}$  est considérée comme étant de 100%. A partir de la concentration initiale, il est possible de suivre la distribution de  $^{13}\text{C}$  par rapport au 100% de départ dans les différents compartiments du système (fraction extractible, non extractible et plante). La différence entre les 100% initialement apportés (T0) et le  $^{13}\text{C}$  total retrouvé dans l'ensemble du système après un temps x est considéré comme perdu (par minéralisation par exemple).

### 3.6.3. Analyses des HAP par UHPLC

Les teneurs en 16 HAP (Chapitre VI) et en phénanthrène (Chapitre IV et V) ont été analysées par chromatographie en phase inverse utilisant un système UHPLC Ultimate 3000 RSLC (Dionex), équipée d'un détecteur à barrette de diodes et d'une colonne Zorba Eclipse PAH RRHD (100 mm x 2,1 mm, 1,8  $\mu\text{m}$  – Agilent). La phase mobile est un mélange eau/acétonitrile en mode gradient, avec un débit de 0.420 mL.min<sup>-1</sup>. La longueur d'onde de détection en UV (Spectre Focus, Dionex) est de 254 nm. Les concentrations ont été quantifiées avec une méthode standard externe.

### 3.6.4. Résonance magnétique nucléaire du carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN)

La technique de RMN du  $^{13}\text{C}$  a été utilisée afin d'identifier la structure chimique des composés organiques issus du  $^{13}\text{C}$ -PHE, en comparant les spectres obtenus à partir des échantillons témoins et des échantillons enrichis. Toutes les analyses de  $^{13}\text{C}$ -RMN (liquide et solide) ont été réalisées au laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations (CRM2) par Gwendal Kervern.

Les échantillons de sol issus des mésocosmes de l'expérimentation avec le  $^{13}\text{C}$ -PHE n'ont pas pu être analysés directement, en raison de la complexité de la matrice. C'est pourquoi ils ont été prétraités selon deux méthodes : (i) un fractionnement par densimétrie (§3.2.2) et (ii) une extraction à l'eau (§3.1.2).

- Le traitement par **fractionnement densimétrique** a consisté à fractionner le sol selon la procédure de séparation densimétrique précédemment détaillée (§3.2) en vue d'éliminer les oxyhydroxydes de fer. Les échantillons issus du fractionnement ont été analysés en  $^{13}\text{C}$ -RMN solide (Figure II-7).

- **L'extraction à l'eau ultrapure** a été réalisée sous haute pression et température. Les extraits aqueux obtenus ont été lyophilisés, solubilisés dans de l'eau deutérée et analysés en  **$^{13}\text{C}$ -RMN liquide**. Quelques milligrammes d'échantillon ont été placés dans un tube de verre cylindrique de 5 mm de diamètre.

- ❖  $^{13}\text{C}$ -RMN liquide

Les spectres ont été constitués sur un aimant de 7.05 T, soit 300 MHz de fréquence proton et 75.5 MHz de fréquence carbone. Pour les spectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN liquide, une sonde double résonance à large bande (sonde dite BBO) de chez Bruker a été utilisée. Pour les expériences permettant de comparer les échantillons avec et sans  $^{13}\text{C}$ , 16384 scans ont été réalisés, et 65536 scans pour le spectre  $^{13}\text{C}$  de bonne qualité (qui permet d'identifier les espèces).

- ❖  $^{13}\text{C}$ -RMN solide

Les spectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN solide ont été déterminés sur le même spectromètre que celui utilisé pour la  $^{13}\text{C}$ -RMN liquide, avec une sonde Bruker 4 mm triple résonances, une « cross polarization » CP et un découplage proton optimisés sur un échantillon d'histidine marqué en  $^{13}\text{C}$ . Il y avait 8192 scans.

### **3.6.5. Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)**

Les analyses en pyrolyse et thermodésorption ont été réalisées à l'aide d'un pyrolyseur Frontier Lab Multi-shot EGA/PY-3030D et d'un piège cryogénique Micro Jet MJT-1030Ex installé sur un chromatographe en phase gazeuse-détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) Agilent 7890B couplé à un spectromètre de masse 5977A (MS). Les injections ont été réalisées en mode split pulsé avec une pression pulsée de 50 psi pendant 0.5 min et un rapport de split 20:1. Les analyses ont été réalisées sur une colonne Agilent DB-5MS (20 m  $\times$  0.18 mm i.d.  $\times$  0.18  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de film) avec de l'hélium en gaz vecteur à un débit constant de 1.6 mL/min. Le débit a été divisé entre le FID et le MS grâce à un contrôleur de pression électronique (EPC) avec une séparation FID/MS de 1/3. L'EPC et les détecteurs sont connectés avec une colonne en silice fondue désactivée. Les températures de l'injecteur et de la ligne de transfert ont été réglées à 320 et 340°C, respectivement. Les températures du

quadripôle et de la source d'ionisation du MS ont été réglées à 150 et 230°C, respectivement. La température du FID a été programmée à 320°C et les débits d'air, d'hydrogène et d'hélium sont de 400 mL/min, 30 mL/min and 25 mL/min, respectivement.

Les échantillons de sol (entre 0,5 et 5 mg) ont été placés dans des creusets dédiés aux analyses par pyrolyse, entre deux filtres en fibre de verre GF/F (Whatman) préalablement lavés aux ultrasons pendant 1 h dans un mélange méthanol/dichlorométhane (50%/50%) et séchés à l'étuve. Du TMAH (25 % w) dissout dans du méthanol (10 µL) est ajouté dans le creuset avant chaque analyse de pyrolyse et de thermodésorption. Les creusets contenant les échantillons ont été placés dans le four de thermodésorption programmé de 250°C à 350°C à 4°C/min ou à 620°C pour les étapes de thermodésorption et de pyrolyse, respectivement. La température de l'interface du pyrolyseur est maintenue à 320°C. Le piège cryogénique permettant la concentration des composés en tête de colonne a été maintenu à 0°C pendant toute l'étape de thermodésorption ou pendant 5 min de pyrolyse, avant les analyses GC réalisées selon le programme de température suivant : 1 min à 40°C, de 40 à 195°C à 25°C/min, un temps de stabilisation de 2 min à 195°C, de 195 à 315°C à 20°C/min, de 315 à 320°C à 5°C/min puis un temps de stabilisation de 3 min à 320°C. L'identification des composés a été confirmée par le spectre de masse obtenu avec le MS en comparaison avec les bases de données NIST08 et Wiley. Les analyses ont été réalisées par Coralie Biache.

### 3.7. Imagerie par NanoSIMS

Les échantillons de sol et de racines (replicats additionnels) issus de l'expérimentation avec le <sup>13</sup>C-PHE ont été analysés en spectrométrie de masse à ions secondaires (NanoSIMS). Cette technique d'imagerie ionique (**Figure II-11**) à haute résolution latérale (< 50 nm) et de masse (très bonne sensibilité) permet de faire de la discrimination isotopique (Slodzian et al., 1991).

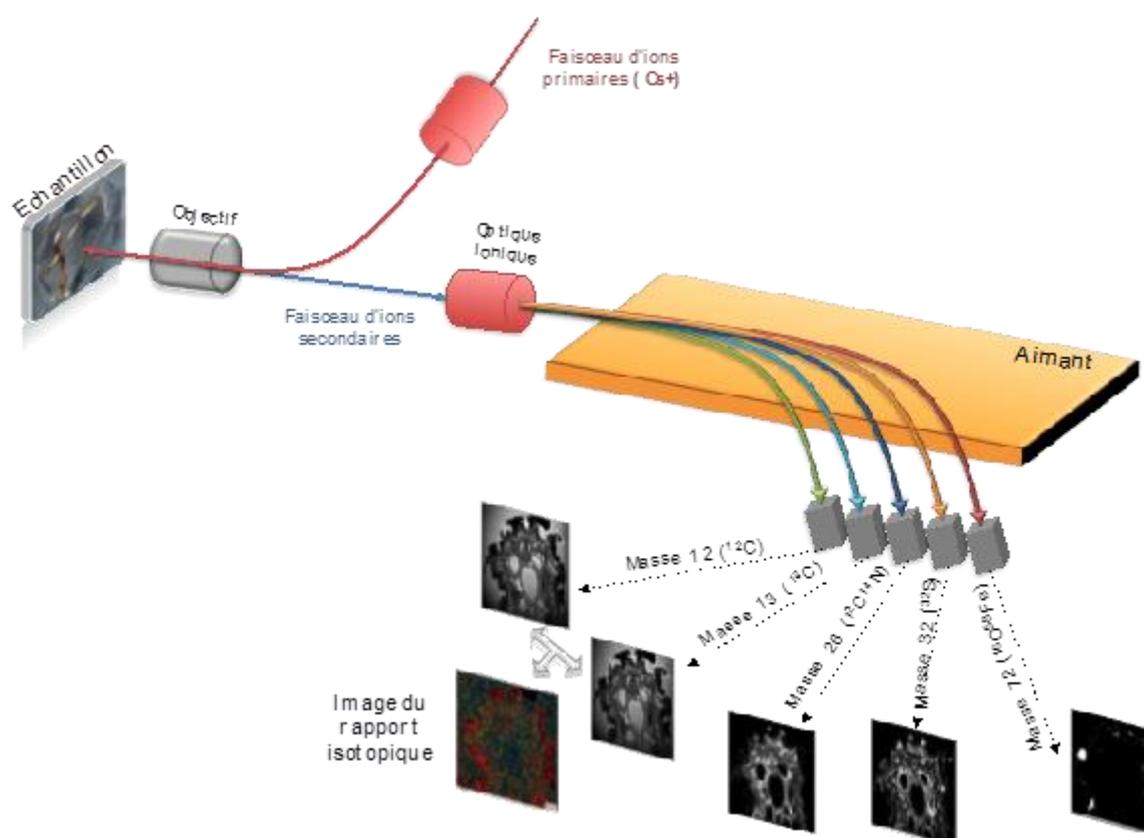


Figure II-11. Schéma du principe de la NanoSIMS CAMECA 50 (adapté de M.Steinhauser et al., 2012).

Le principe, la méthodologie et l'acquisition des données pour les analyses d'images de la NanoSIMS seront développés dans le chapitre III.

**Echantillonnage du sol et de la plante.** Les échantillons de sol et de racine ont été préparés séparément avec des méthodologies distinctes. La préparation et les analyses ont été réalisés au Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST) à Belval en collaboration avec Jean-Nicolas Audinot et Patrick Grysan. Les échantillons utilisés ont été prélevés à 0, 7 et 14 jours d'expérimentation, le sol d'un côté et la biomasse végétale de l'autre. Pour le sol, des agrégats de taille inférieure à 10 mm ont été échantillonnés et pour la biomasse végétale les tiges et les racines (non-rincées) ont été récoltées indépendamment.

Les agrégats de sol ont été récoltés frais, à l'aide d'une pince et gardés entiers puis enrobés dans une résine Epoxy. Les parties aériennes ont été séparées des racines, ces dernières ont été récoltées sans être rincées afin de conserver les particules de sol adhérentes, et de ne pas analyser uniquement la racine mais l'interface sol-racine. La biomasse végétale a

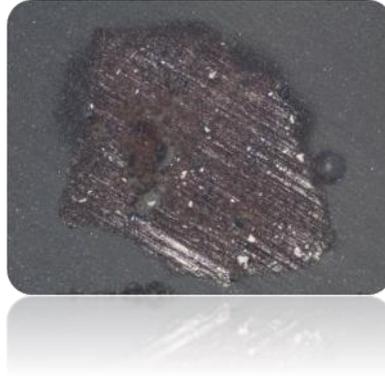
été conservée à 4°C pour les échantillons récoltés après 7 jours d'essai et ceux échantillonnés à 14 jours ont été préparés le jour même. Les racines prélevées ont été congelées puis déshydratées (par sublimation), avant d'être enrobées.

**Préparation des racines.** Les racines fraîches de ray-grass ont été récoltées, coupées à l'aide d'un scalpel sur environ 0.5 cm de long. Elles ont ensuite été cryofixées par congélation rapide afin d'immobiliser efficacement les constituants cellulaires tout en préservant l'échantillon. La cryofixation a été faite à pression atmosphérique ( $10^5$  C/s) dans une chambre de cryofixation, Leica EM CPC Universal Cryoworkstation. Une fois congelées, les racines ont été lyophilisées (LEICA EM CFD) sans l'utilisation d'aucun solvant. La déshydratation a été effectuée à basses températures, pour empêcher la formation de cristaux de glace. Le système Leica permet d'obtenir les différents paliers de températures nécessaires ( $1^\circ\text{C h}^{-1}$  sur 8 jours jusqu'à  $-20^\circ$  à  $1.10^{-4}$  Pa). Lorsque le système a atteint  $-20^\circ\text{C}$ , une résine Epoxy a été injectée pour être polymérisée (par UV). Une fois les racines enrobées (**Figure II-12**), les blocs ont pu être rectifiés et polis (des essais ont été réalisés à l'ultramicrotome mais la préparation de lame a été stoppée car le tissu ne restait pas intègre).



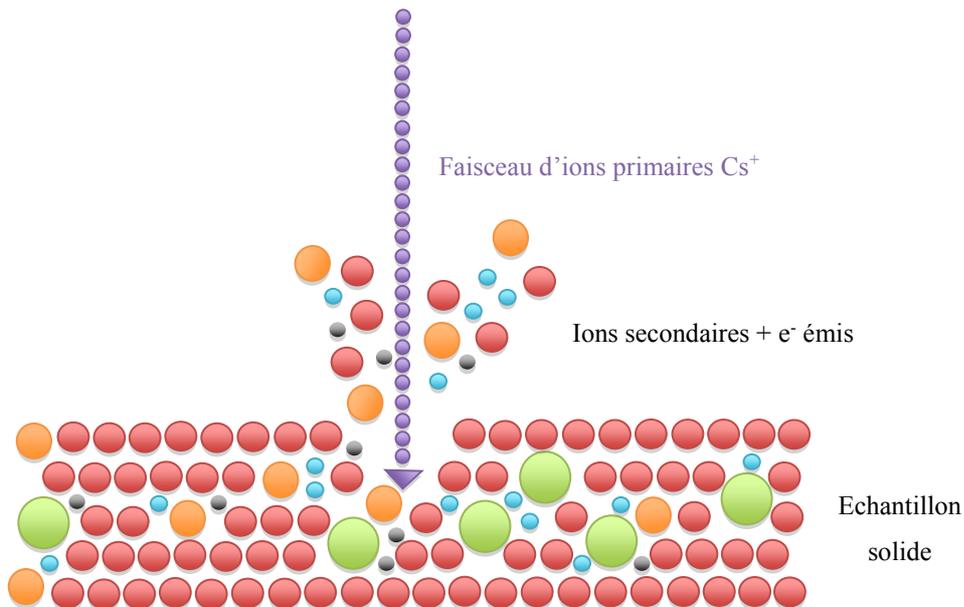
**Figure II-12.** Racines de Ray-grass enrobées.

**Préparation des agrégats.** Les agrégats de sol ont été prélevés à 0, 7 et 14 jours et introduits dans des microtubes (Ependorff, 2 mL). Une résine a été coulée et polymérisée entièrement en moins de 24 h à basse température. Les blocs de résine ont ensuite pu être rectifiés (**Figure II-13**) en vue d'obtenir un échantillon possédant une surface plane pour l'observation en NanoSIMS. La dernière étape est celle de la métallisation (Au), qui permet de rendre l'échantillon conducteur et ainsi éviter tout effet de charge.



**Figure II-13.** Agrégats de sol enrobés et rectifiés.

**Analyses NanoSIMS.** Les échantillons enrobés, métallisés et rectifiés ont été déposés sur un porte-échantillon afin d'être analysés. L'instrument utilisé est une NanoSIMS CAMECA50, nouvelle génération de microsonde. Un faisceau d'ions primaires ( $\text{Cs}^+$ ) balaye la surface de l'échantillon perpendiculairement produisant des électrons et des ions secondaires (**Figure II-14**). Ces derniers sont amenés dans un champ magnétique pour être analysés en masse (séparés en fonction de leur ratio  $m/z$ ). Jusqu'à 5 éléments ont pu être détectés, le spectromètre possédant jusqu'à 5 détecteurs (**Figure II-11**). Les 5 éléments retenus pour les analyses ont été cartographiés grâce aux ions secondaires produits correspondants. Ainsi, nous avons pu obtenir des images représentant la distribution des ions  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  (pour l'élément azote c'est l'ion cyanure qui est détecté puisque l'azote est très peu ionisable),  $^{32}\text{S}^-$  et  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$ .



**Figure II-14.** Schéma représentant l'extraction d'ions secondaires par balayage de la surface d'un échantillon à l'aide d'un faisceau d'ions primaires ( $\text{Cs}^+$ ).

L'analyse des images obtenues par spectrométrie de masse à ions secondaires a été réalisée à l'aide du logiciel libre Image J. Image J a été développé pour faire du traitement d'images, possible à partir d'images provenant de cet instrument grâce au plugin OpenMIMS.

#### **4. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 3.1.3 (2015). Tous les tests ont été utilisés avec un niveau de significativité de 95%. Avant de choisir le test statistique, les conditions paramétriques sont vérifiées : (i) la normalité en utilisant le test de Shapiro et (ii) l'homogénéité des variances par un test de Bartlett.

Ainsi, une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs suivi d'un test post hoc de Tukey a été utilisée pour tester un éventuel effet plante et temps par rapport aux concentrations en phénanthrène et en isotope ( $^{13}\text{C}$ ). Pour comparer les ratios élémentaires obtenus après les analyses en NanoSIMS, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé, suivi d'un test post hoc de Wilcoxon (les conditions paramétriques testées n'étant pas validées).



**Chapitre III. Approche  
méthodologique et analytique de  
la NanoSIMS**



## 1. Introduction

La NanoSIMS a été couramment utilisée en sciences du sol et du végétal pour étudier la dynamique de composés organiques à très petite échelle dans le sol (Hatton et al., 2015; Mueller et al., 2012) et dans la rhizosphère (Blair et al., 2006; Cliff et al., 2002; Clode et al., 2009; Derito et al., 2005; A. Herrmann et al., 2007a; A. M. Herrmann et al., 2007; Keiluweit et al., 2012; Pumphrey et al., 2009). Cependant, son utilisation dans les études sur le devenir des contaminants organiques dans les sols reste encore limitée. Afin de mieux comprendre le comportement des HAP dans les sols nous avons choisi d'utiliser un mésocosme sol-plante avec du phénanthrène marqué ( $^{13}\text{C}$ -PHE) combiné à la NanoSIMS pour (i) localiser le  $^{13}\text{C}$  issu du phénanthrène dans le sol et la plante et (ii) suivre son évolution au cours du temps.

Ce chapitre se focalise sur le traitement des images obtenues pour deux types d'échantillons : les agrégats de sol et les racines de ray-grass provenant des mésocosmes. Concernant le compartiment sol des dispositifs, nous nous sommes intéressés à la dynamique du carbone au sein de l'unité structurale, l'agrégat. Pour les racines de ray-grass, nous avons choisi de ne pas éliminer les particules de sol adhérentes afin de préserver les « interfaces sol-plante-microorganismes » représentatives de la rhizosphère, lieu d'échanges intenses.

Il est question ici de mettre en avant les procédures et les outils qui ont permis d'acquérir les données images. Actuellement, plusieurs programmes destinés à traiter et à analyser les données NanoSIMS existent dont OpenMIMS utilisable via Image J (open-source) qui offre de nombreuses fonctions incluant la sélection des régions d'intérêts (ROIs), les linescans et la réalisation d'images composites.

Les différentes procédures et traitements utilisés pour l'analyse des images et les résultats sont décrits successivement dans ce chapitre.

## 2. Méthodologie et acquisition des données de NanoSIMS

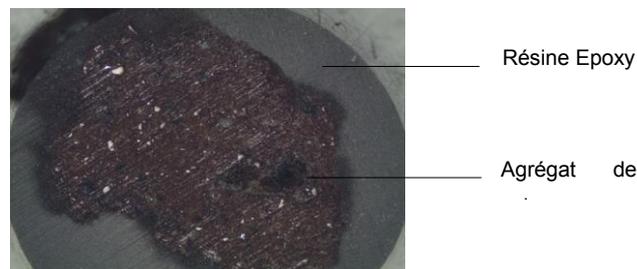
Les agrégats de sol et les racines échantillonnés ont été fixés, déshydratés, enrobés puis métallisés. Les différentes méthodes de préparation utilisées ont été détaillées dans le Chapitre II.

## 2.1. Identification des zones d'intérêts

Des observations préliminaires ont été réalisées au microscope optique par réflexion afin d'identifier les zones pertinentes pour les analyses par NanoSIMS. Les **Figures III-1 et III-2** présentent respectivement un échantillon de sol et un échantillon de racines enrobés.

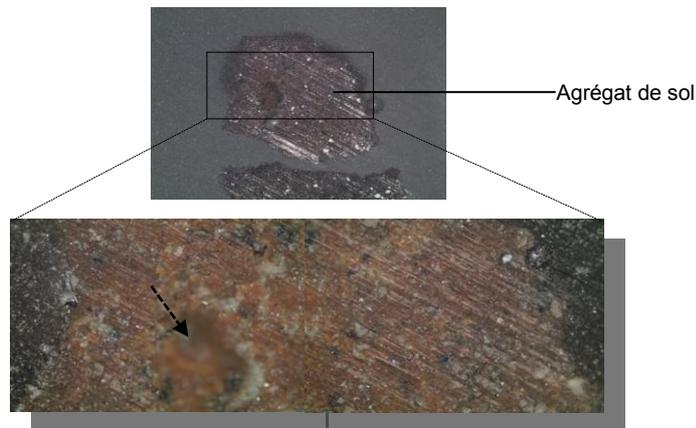
### 2.1.1. Agrégats de sol

Les agrégats de sol enrobés ont été rectifiés afin d'obtenir la surface la plus plane possible. La **Figure III-1** montre un agrégat de sol observé au microscope optique ayant permis d'identifier les zones les plus pertinentes à analyser par NanoSIMS.



**Figure III-1.** Agrégat de sol enrobé dans une résine époxy et observé au microscope optique.

Il est important de définir des zones d'intérêt en amont, afin d'éviter de se focaliser sur des régions qui n'ont aucune chance de fournir un signal. Des agrandissements ont pu être réalisés sur certaines parties des échantillons afin de mettre plus précisément en évidence les zones sur lesquelles concentrer les analyses par NanoSIMS (**Figure III-2**). La partie de l'agrégat de sol agrandie présente une zone difficilement identifiable (floue), qui a typiquement été écartée de l'analyse afin de s'assurer un signal.



**Figure III-2.** Agrandissement au microscope optique d'une partie d'un agrégat de sol enrobé.

### 2.1.2. Racines de Ray-Grass

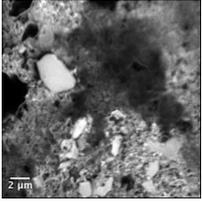
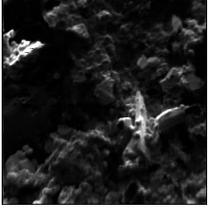
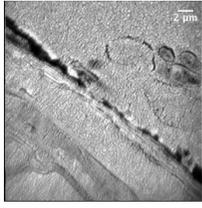
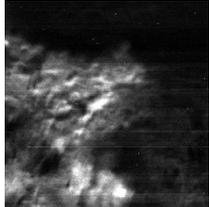
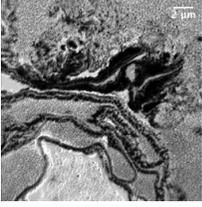
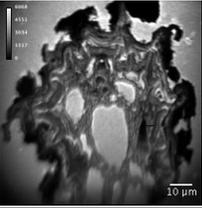
A la fin de la procédure d'enrobage, des coupes ont été réalisées à l'ultramicrotome afin de réaliser des lames minces. Lors des découpes une partie du tissu racinaire a été arrachée, cette méthode a été abandonnée et les échantillons ont finalement été rectifiés au diamant. La **Figure III-3** montre un exemple d'échantillon de racines de ray-grass enrobées, qui a été poli (les zones entourées sur l'image sont celles qui ont été analysées).



**Figure III-3.** Echantillon de racines de ray-grass enrobées qui a été rectifié par un polissage au couteau diamant.

Une fois que les zones à analyser ont été définies, que ce soit pour les agrégats ou pour les racines, les échantillons ont été analysés au spectromètre de masse à ions secondaires. Les réglages utilisés lors des analyses ont été précisés dans le chapitre précédent (II). Chaque zone analysée de l'échantillon a permis d'obtenir 5 images d'ions secondaires correspondant aux masses des éléments choisis en amont (**Tableau III-1**). Les fichiers d'images des ions secondaires se composent des images individuelles obtenues pour chaque scan (balayage d'un plan), pour chaque masse sélectionnée et sont accompagnés des métadonnées décrivant les conditions de l'analyse. Les images acquises sur l'instrument CAMECA ont pu être visualisées et traitées à l'aide des programmes Winimage et OpenMIMS. L'avantage de ce dernier est d'être libre d'accès et d'offrir une multitude de fonctions pour l'exploitation des images incluant les régions d'intérêt, les linescans et les images composites.

Tableau III-1. Echantillons issus de l'expérimentation  $^{13}\text{C}$ -PHE analysés en NanoSIMS.

Temps d'échantillonnage	Agrégats		Racines		Images SIMS		Eléments cartographiés	
	$^{12}\text{C}$ (témoin)	$^{13}\text{C}$ (enrichi)	$^{12}\text{C}$ (témoin)	$^{13}\text{C}$ (enrichi)	Agrégat	Racine	Agrégat	Racine
T0	x		x	x		x	$^{12}\text{C}^-$ , $^{13}\text{C}^-$ , $^{16}\text{O}^-$ , $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ , $^{32}\text{S}^-$ et $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$	x
T7	x						$^{12}\text{C}^-$ , $^{13}\text{C}^-$ , $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ , et $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$ $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}^-$ (et $^{16}\text{O}^-$ )	$^{12}\text{C}^-$ , $^{13}\text{C}^-$ , $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ , $^{32}\text{S}^-$ et $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$
T14_1	x		✓					
T14_2								

Les échantillons de sol et de racines sont issus des mésocosmes « additionnels » (témoins et enrichis) de l'expérimentation avec marquage au  $^{13}\text{C}$ -PHE. Pour les agrégats, nous avons choisi d'analyser un échantillon prélevé à 0, à 7 et à 14 jours afin d'essayer d'observer la migration du  $^{13}\text{C}$  à l'intérieur de la particule de sol. Un suivi temporel a également eu lieu pour les échantillons racinaires mais pour deux temps seulement, à 7 et à 14 jours. La localisation de l'isotope  $^{13}\text{C}$  n'a pas uniquement été faite au sein du tissu racinaire mais dans la zone d'activité hétérogène et biologiquement très active que représente la rhizosphère. Quatre échantillons de racines enrobés et rectifiés ont été sélectionnés pour être analysés au spectromètre de masse à ions secondaires. Le premier est un échantillon témoin non marqué au  $^{13}\text{C}$ -PHE qui a servi de référence (blanc,  $^{12}\text{C}$ ). Il a été analysé afin d'obtenir un signal correspondant à la valeur d'abondance naturelle de l'isotope 13 du carbone (du  $^{13}\text{C}$ ). Il a donc servi de référence pour les échantillons enrichis. Ensuite, l'analyse NanoSIMS a été réalisée sur trois autres échantillons de racines enrichis au  $^{13}\text{C}$ -PHE, et récoltés à 7 et à 14 jours (T7, T14\_1 et T14\_2) (**Tableau III-1**).

## 2.2. Traitement des images de NanoSIMS

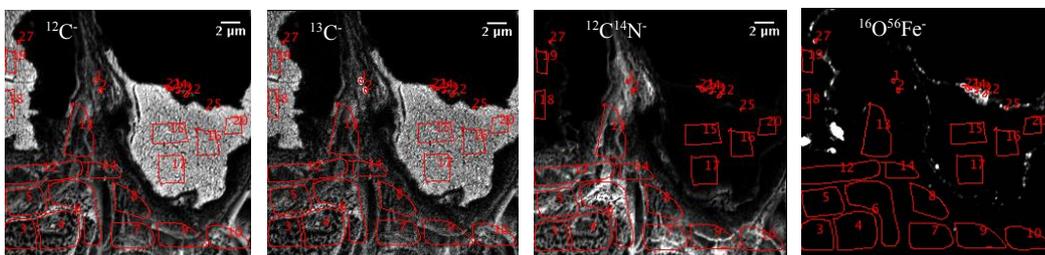
### 2.2.1. Les régions d'intérêt (ROIs)

Lors du traitement des images de SIMS, la sélection de régions d'intérêt (ROIs) est très couramment utilisée pour analyser une zone caractéristique de l'image. La ROI définit un groupe de pixels donnant les valeurs d'intensité (exprimées en cps.sec<sup>-1</sup>) correspondantes pour chaque espèce d'ions secondaires choisie. Dans la plupart des applications de traitement d'images, une ROI peut être dessinée directement sur l'image. Mais définir les ROIs est une étape délicate, sans critère objectif, il est possible de modifier les valeurs d'enrichissement isotopique juste en changeant la taille d'un ROI. Les meilleurs critères de sélection d'une ROI sont les images externes (acquises en MET par exemple) ou les images d'un ion seul (e.g.  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$  pour les oxydes de fer). Dans d'autres cas, il est nécessaire de juger visuellement la distribution spatiale de plusieurs ions pour interpréter et définir proprement les ROIs. A l'heure actuelle, il n'existe pas de procédure standard pour la sélection d'éléments caractéristiques au sein d'une matrice complexe telle que le sol.

Les différents éléments sélectionnés :  $^{12}\text{C}^-$ , le  $^{13}\text{C}^-$ , le  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ , le  $^{32}\text{S}^-$ ,  $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}^-$ ,  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  pour l'étude (**Tableau III-1**) ont été cartographiés et sont représentés par une image d'ion

secondaire. Les images générées font typiquement  $25 \times 25 \mu\text{m}^2$  (soit  $256 \times 256$  pixels) et permettent de visualiser la distribution élémentaire et isotopique dans l'échantillon. Les images d'ions secondaires  $^{12}\text{C}^-$  et  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  sont caractéristiques de la MO, alors que les signaux  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  et  $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}^-$  sont attribués aux particules minérales du sol. L'image produite pour l'ion  $^{13}\text{C}^-$  révèle la distribution de l'isotope au sein des échantillons et celle du  $^{12}\text{C}^-$  seule, la distribution de la résine.

*Exemple de sélection de ROI.* La **Figure III-4** présente un exemple de ROIs définies sur les images d'ions secondaires obtenues pour un échantillon de racines à l'aide du programme OpenMIMS. Les ROIs ont été dessinées manuellement (entourées sur les images) et numérotées. Elles ont été définies sur les images en fonction de leurs traits caractéristiques et ont été regroupées dans 4 groupes distincts : Hotspot, Racine, Minéral et Résine. Les zones ont ainsi pu être identifiées par rapport à l'intensité et l'hétérogénéité de certains ions élémentaires. C'est le cas pour l'image de l'ion secondaire  $^{13}\text{C}^-$  sur laquelle deux points sont facilement remarquables et ont permis de former un premier groupe de ROIs (*Hotspot*). Les éléments caractéristiques de la matière organique sont aisément discernables avec les images des ions  $^{12}\text{C}^-$  et  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ , plusieurs ROIs y ont été définies pour former un second groupe (*Racine*). Les zones de fortes intensités en ions secondaires  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  ont été sélectionnées pour former les ROIs constitutives du groupe *Minéral*. Le dernier groupe (*Résine*) a été formé par des ROIs sélectionnées sur l'image de l'ion secondaire  $^{12}\text{C}^-$  dans des zones où l'intensité de l'élément est très marquée. Pour la plupart des résines (ex : Araldite 502), le rapport  $^{12}\text{C}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  très élevé permet de différencier la MO provenant de l'échantillon des agents d'enrobage (Heister et al., 2012).

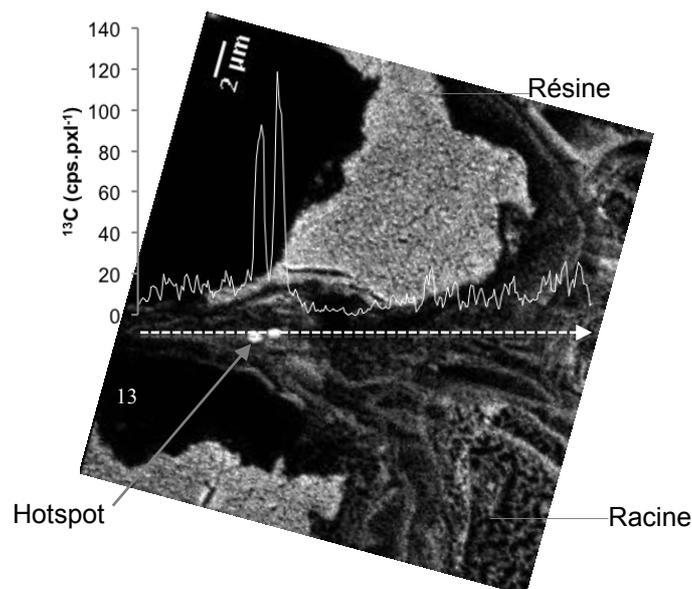


**Figure III-4.** Exemple de sélection de ROIs identifiées par des chiffres sur des images d'ions secondaires obtenues pour un échantillon de racines avec Image J (open-source).

Après avoir définis les ROIs, les données ont été extraites et interprétées. Les valeurs des rapports élémentaires et isotopiques ont été obtenues à partir des données fournies pour chaque ROI. Les ratios élémentaires  $^{12}\text{C}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ ,  $^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  et  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}/^{12}\text{C}$  choisis pour ce travail, ont été calculés à partir des données brutes extraites des ROIs dessinées sur les images non corrigées en utilisant le logiciel Image J. Cependant, une exception a été faite pour les rapports isotopiques ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) qui ont été calculés à partir des données extraites des ROIs dessinées par le programme Winimage (fourni par CAMECA) et qui ont permis de mesurer la déviation isotopique ( $\delta$  ‰).

### 2.2.2. Linescans

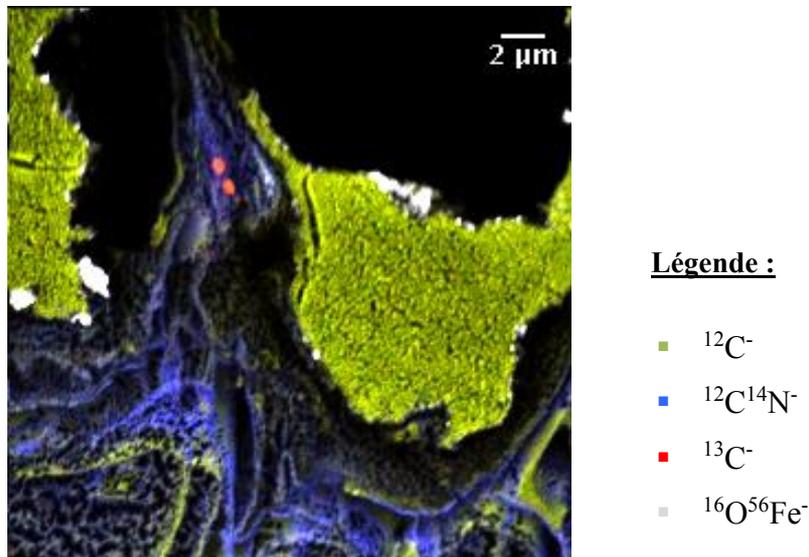
En plus de la sélection de régions d'intérêt sur l'image, des transects ont pu être tracés sur les images le long de zones pertinentes. Les segments tracés sur les images NanoSIMS peuvent être de longueurs variables, et sont appelés linescan. Il permet de fournir des informations sur la distribution des éléments le long d'un transect choisi. Sur les images acquises au cours de l'étude, les linescans ont été dessinés à partir du logiciel Image J. Pour chaque linescan tracé, une représentation graphique est donnée et représente l'intensité de l'élément considéré (nombre de coups par pixels) en fonction de la distance sur le segment ( $\mu\text{m}$ ). Un exemple de linescan est donné dans la **Figure III-5**, où un segment (représenté par une flèche) est tracé de part et d'autre de l'image. Le graphique obtenu le long de ce profil pour l'ion secondaire  $^{13}\text{C}^-$  est donné et représente la distribution spatiale de l'élément. Il est possible d'obtenir ce type de graphique pour chaque élément cartographié sur un même tracé.



**Figure III-5.** Exemple de LINESCAN : le segment (flèche blanche) et les données générées (sous la forme d'une représentation graphique) pour l'ion secondaire  $^{13}\text{C}^-$  (échantillon de racines  $^{13}\text{C}$ -PHE, à 14 jours) sont représentés sur l'image.

### 2.2.3. Image composite

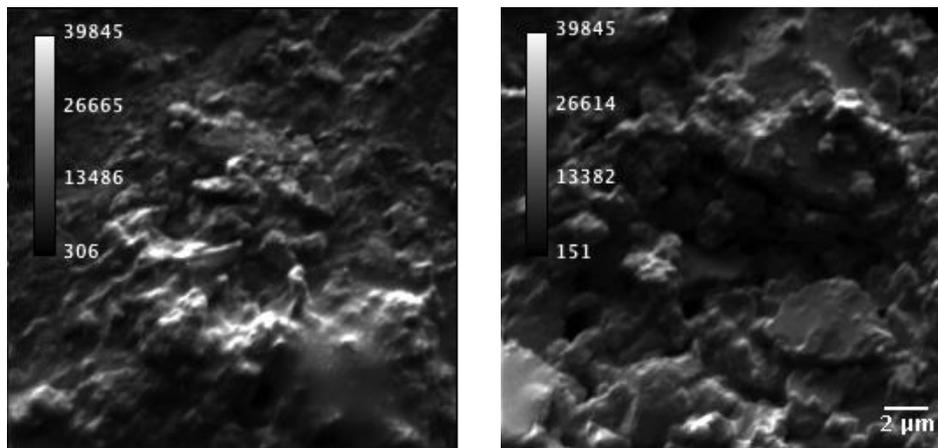
A partir du module OpenMIMS utilisé avec Image J, il est également possible de créer des images composites. Elles sont obtenues par la superposition de plusieurs images d'ions secondaires, jusqu'à 4 images peuvent être assemblées simultanément. Un exemple d'image composite obtenu à partir d'une des images acquises au cours de l'analyse d'un échantillon de racines est présenté dans la **Figure III-6**. L'image composite est produite par l'addition des images d'ions secondaires  $^{12}\text{C}^-$  (vert),  $^{13}\text{C}^-$  (rouge),  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  (bleu) et  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$  (blanc). Les tissus racinaires sont clairement identifiables sur l'image grâce à l'image de l'ion cyanure  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  (bleu). La résine est visualisée essentiellement par l'intensité du signal fourni pour l'élément  $^{12}\text{C}$  (vert). Les points pour lesquels l'intensité du signal obtenue pour l'ion secondaire  $^{13}\text{C}^-$  (rouge) est élevée sont désignés « hotspots » tout au long de ce chapitre. Les images composites permettent de localiser dans l'espace les régions où un élément est plus représenté qu'un autre. Sur la **Figure III-6**, la résine (vert), le tissu racinaire (bleu), les particules minérales (blanc) et les points chauds « hotspots » (rouge) sont facilement reconnaissables.



**Figure III-6.** Image composite obtenue par la superposition des images d'ions secondaires  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  et  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$ .

#### 2.2.4. Biais potentiel lors de l'analyse des agrégats de sol

La NanoSIMS possède également un détecteur d'électrons secondaires qui lui permet de générer des images fournissant des informations topographiques (relief) de la surface de l'échantillon. La topographie de l'échantillon peut causer un biais lors des analyses en NanoSIMS comme pour les agrégats de sol (du fait de leur rugosité), et de ce fait affecter la production des ions  $II^+$ . Un exemple d'images d'électrons  $II^+$  obtenues à partir de deux agrégats de sol préalablement enrobés et polis est présenté sur la **Figure III-7**.



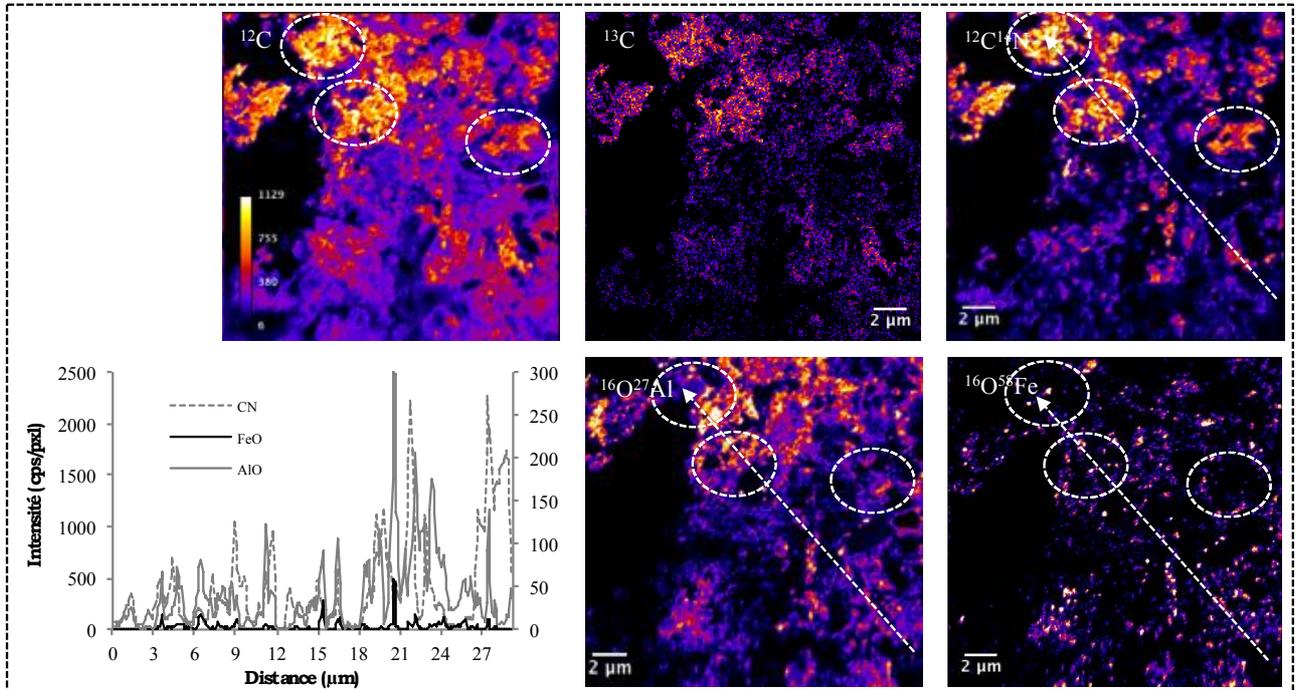
**Figure III-7.** Images d'électrons secondaires acquises après pulvérisation de surface d'agrégats de sol

Les images NanoSIMS des électrons  $II^+$  font approximativement  $25 \times 25 \mu\text{m}$ . Un signal est observé rendant apparent le relief assez prononcé pour chacun des échantillons. Il peut être à l'origine des artefacts occasionnés lors de l'analyse. La topographie résiduelle ne va pas être optimale pour l'obtention des signaux en ions secondaires, et plus particulièrement pour le signal en  $^{13}\text{C}$ . Mueller et al. (2012) ont mis en évidence que les macroagrégats de sol dont le diamètre dépasse  $250 \mu\text{m}$  présentent un relief trop large pour obtenir des mesures précises en NanoSIMS. Les effets de charge peuvent aussi poser problème lors des analyses. Afin de les minimiser, un canon à électrons va fournir des  $e^-$  sur la surface pulvérisée durant l'analyse par NanoSIMS (Oehler et al., 2007). Par ailleurs, en amont de l'analyse, l'échantillon peut être recouvert sur quelques nm d'épaisseur (en surface) d'éléments conducteurs (Au par exemple).

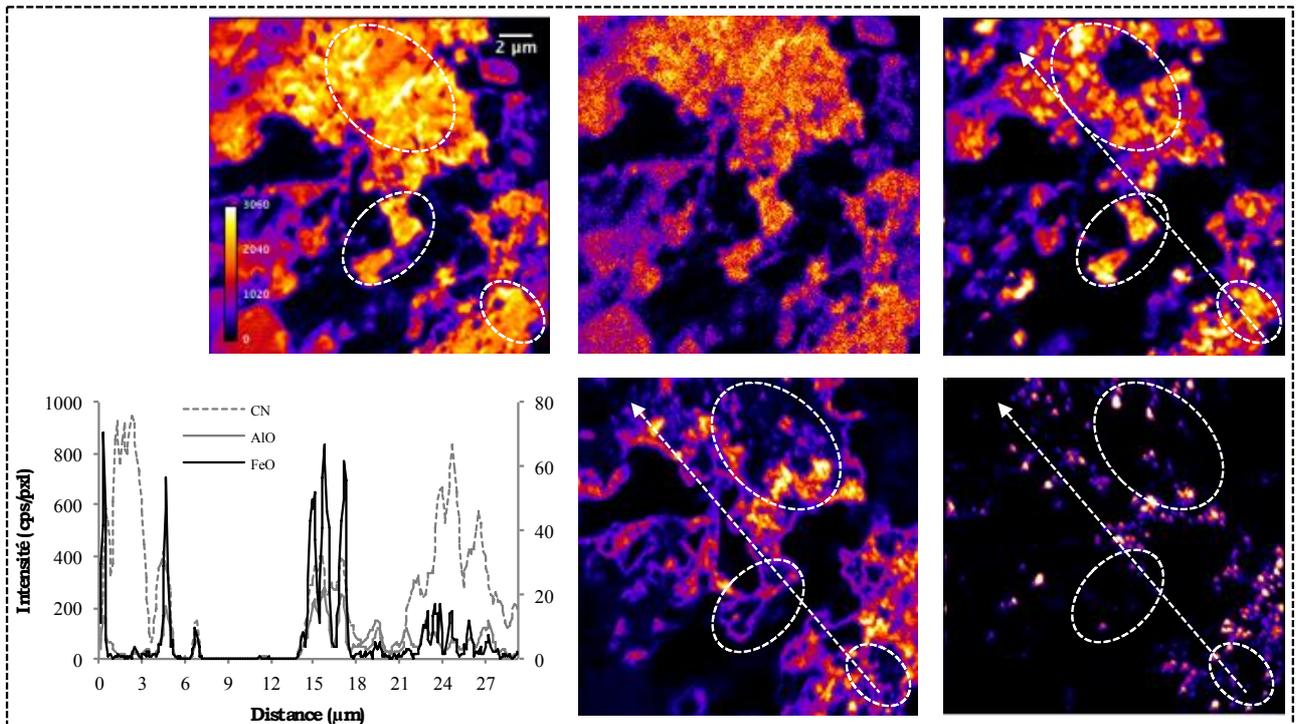
### 3. Résultats & Discussion

#### 3.1. Analyses des agrégats de sol à l'échelle micrométrique.

##### Echantillon 1



##### Echantillon 2



**Figure III-8.** Répartition des ions secondaires  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ , le  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}$ ,  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}$  (de gauche à droite) au travers des images NanoSIMS obtenues pour deux agrégats de sol échantillonnés à 7 jours.

Les ions secondaires  $^{12}\text{C}^-$ , le  $^{13}\text{C}^-$ , le  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ,  $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}^-$ ,  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  qui ont été cartographiés sont représentés sur la **Figure III-8**. Chaque échantillon (1 et 2) correspond à un macroagrégat de sol marqué au  $^{13}\text{C}$ -PHE et échantillonné à 7 jours. Les différentes images permettent de visualiser la distribution élémentaire et isotopique dans l'échantillon. Pour les deux échantillons, les ions secondaires  $^{12}\text{C}^-$  et  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  présentent un signal intense, pas sur l'ensemble de la zone balayée mais de manière hétérogène au niveau de patchs (régions entourées sur l'image). Des spots sont aussi visibles pour les ions secondaires  $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}^-$ ,  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  avec le même constat : la distribution spatiale élémentaire est hétérogène. Les spots de forte intensité repérés sur les images des ions  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  et  $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}^-$  sont de tailles variables. Les spots visibles sur l'image de l'ion Fe semblent cependant plus homogènes, avec une taille n'excédant pas 2  $\mu\text{m}$ . En revanche, pour les deux exemples présentés, aucun signal en  $^{13}\text{C}$  n'est détecté et le résultat est le même pour l'ensemble des échantillons de sol analysés que ce soit à 0, à 7 ou à 14 jours (images non présentées pour les temps 0 et 14 jours). Par conséquent, le carbone marqué provenant du PHE n'a pas pu être localisé dans les microenvironnements des agrégats. Cependant, les analyses par IRMS (**Chapitre IV**) réalisées en parallèle pour doser le  $\delta^{13}\text{C}$  dans le sol à l'échelle globale ont montré un enrichissement à 7 jours, ce qui démontre que du  $^{13}\text{C}$  provenant du polluant est bien présent dans le sol mais n'est pas visualisé à l'échelle micrométrique pour les quelques agrégats de sol analysés en NanoSIMS. Malgré le potentiel de la NanoSIMS pour détecter un traceur isotopique (Mueller et al., 2013), nous ne l'observons pas ici.

De nombreuses études ont utilisé un isotope stable pour suivre son devenir dans les microenvironnements complexes des sols. Mueller et al. (2012), qui ont aussi travaillé sur des macroagrégats (enrobés dans de la résine) issus d'un sol naturel, auquel un mélange d'acide aminé marqué a été appliqué, ont montré un enrichissement hétérogène. Vogel et al. (2014) ont aussi mis en évidence la présence d'une MO répartie de façon hétérogène sur les particules de sol. L'hétérogénéité de la MO peut être due aux différentes capacités de sorption que peut fournir un sol par rapport aux phases minérales le constituant (Mueller et al., 2013). Concernant notre étude, le suivi du polluant se fait dans l'agrégat de sol entier et non dans des fractions de sol (Hatton et al., 2015; Moni et al., 2012). La détection simultanée des espèces d'ions  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  et  $^{12}\text{C}^-$  dérivés des composants organiques et des espèces  $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}^-$ ,  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  dérivés des constituants inorganiques donne la possibilité d'identifier les associations organo-minérales du sol.

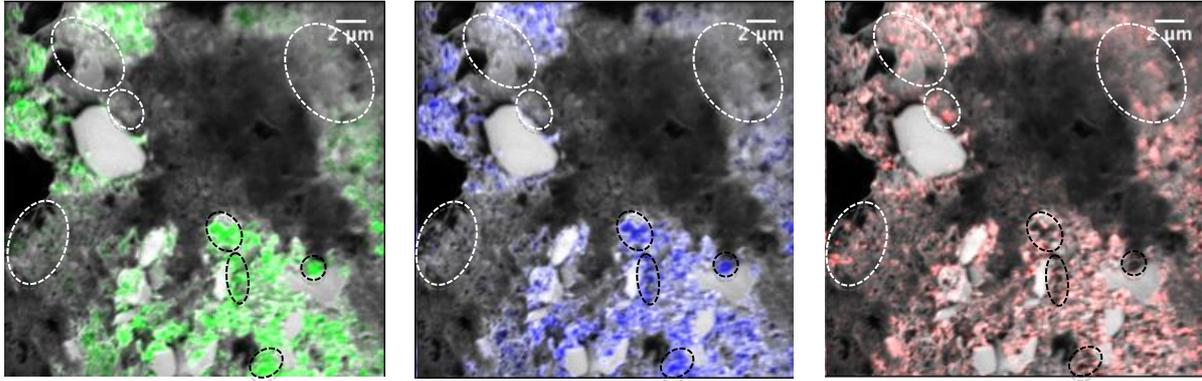
Des exemples de linescans sont donnés pour chacun des échantillons sur la **Figure III-8**. Ils ont été définis au travers des images d'ions secondaires et fournissent des informations

sur la distribution spatiale hétérogène pour les ions  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  et  $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}^-$ ,  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$ . Les deux derniers ions cités apportent des informations sur la répartition des particules minérales dans le sol, quant aux ions  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  ils donnent des indications sur la distribution spatiale de la MO le long du segment. Pour le linescan de l'échantillon 1, lorsque le signal en  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  est élevé, le signal en  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  est très faible alors que celui en ions  $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}^-$  est plus important excepté sur les derniers  $\mu\text{m}$  du segment où les signaux en ions  $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}^-$ ,  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  sont très faibles pour un signal  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  fort. Lorsque les intensités les plus élevées pour le cluster  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  sont observées, le signal en ions  $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}^-$  l'est également, ces deux éléments sont co-localisés sur toute la distance du segment.

Pour le linescan de l'échantillon 2, la distribution des éléments distinguée le long du profil est toujours hétérogène mais cette fois l'intensité du signal en ions  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  est plus importante que celui obtenu pour les ions secondaires  $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}^-$ . Néanmoins, à chaque fois que l'intensité du signal est fort pour l'ion Fe, le signal en Al est détecté conjointement. Ces deux éléments sont donc toujours co-localisés sur l'ensemble du segment. Le nombre de coups pour l'ion cyanure  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  est très élevé à certains endroits du profil, où ils sont très souvent détectés en même temps que les ions métalliques sauf sur les premiers  $\mu\text{m}$  du segment où les ions  $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}^-$ ,  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  ne sont quasiment pas repérés mais où le signal en ions  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  est très élevé. Même si les rapports varient, les ions  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  ne sont jamais localisés seul le long des linescans mais associés aux ions  $^{16}\text{O}^{27}\text{Al}^-$ . L'absence de signal isolé pour les ions  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  ne permet pas d'identifier d'oxydes de fer mais suggère plutôt des minéraux argileux dont la structure est constituée par les éléments O, Al et Fe (Heister et al., 2011). C'est le cas de la vermiculite ou encore de l'illite cette dernière étant identifiée dans le sol d'étude (Chapitre V). Le sol dont sont issus les agrégats est constitué de 11% de fer total, de 6% d'aluminium total, et de 2,3% de matière organique. Eusterhues et al. (2005) et d'autres auteurs affirment, que les oxydes de fer représentent le substrat le plus important dans les formations organo-minérales. Toutefois les minéraux argileux ont aussi un rôle important à jouer dans la dynamique du C, et peuvent être identifiés par un signal en  $^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^-$  et en  $^{28}\text{Si}^-$  (Heister et al., 2011).

Heister et al. (2011) ont montré que deux types de particules organiques pouvaient être généralement distinguées, celles dont le signal en  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  est aussi élevé que celui du  $^{12}\text{C}^-$ , et celles dont seul le signal des ions secondaires  $^{12}\text{C}^-$  est dominant. On le voit bien sur les images des zones (échantillon 2 surtout) où le signal en C est important alors que celui de  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  ne l'est pas.

D'autres éléments majoritairement présents dans les minéraux auraient pu être cartographiés comme le silicium (Si) ou l'oxygène seul (O). Dans l'étude de Vogel et al. (2014), les particules minérales ont été visualisées grâce à l'image NanoSIMS des ions secondaires  $^{16}\text{O}^-$ . Un exemple est donné dans la **Figure III-9** pour un des agrégats de sol échantillonné à T0.



**Figure III-9.** Images composites obtenues par la superposition des images d'ions secondaires (a)  $^{16}\text{O}^-$  (blanc)  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  (vert) (b)  $^{16}\text{O}^-$  (blanc) et  $^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^-$  (bleu) (c)  $^{16}\text{O}^-$  (blanc) et  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  (rouge) pour un agrégat de sol à T0

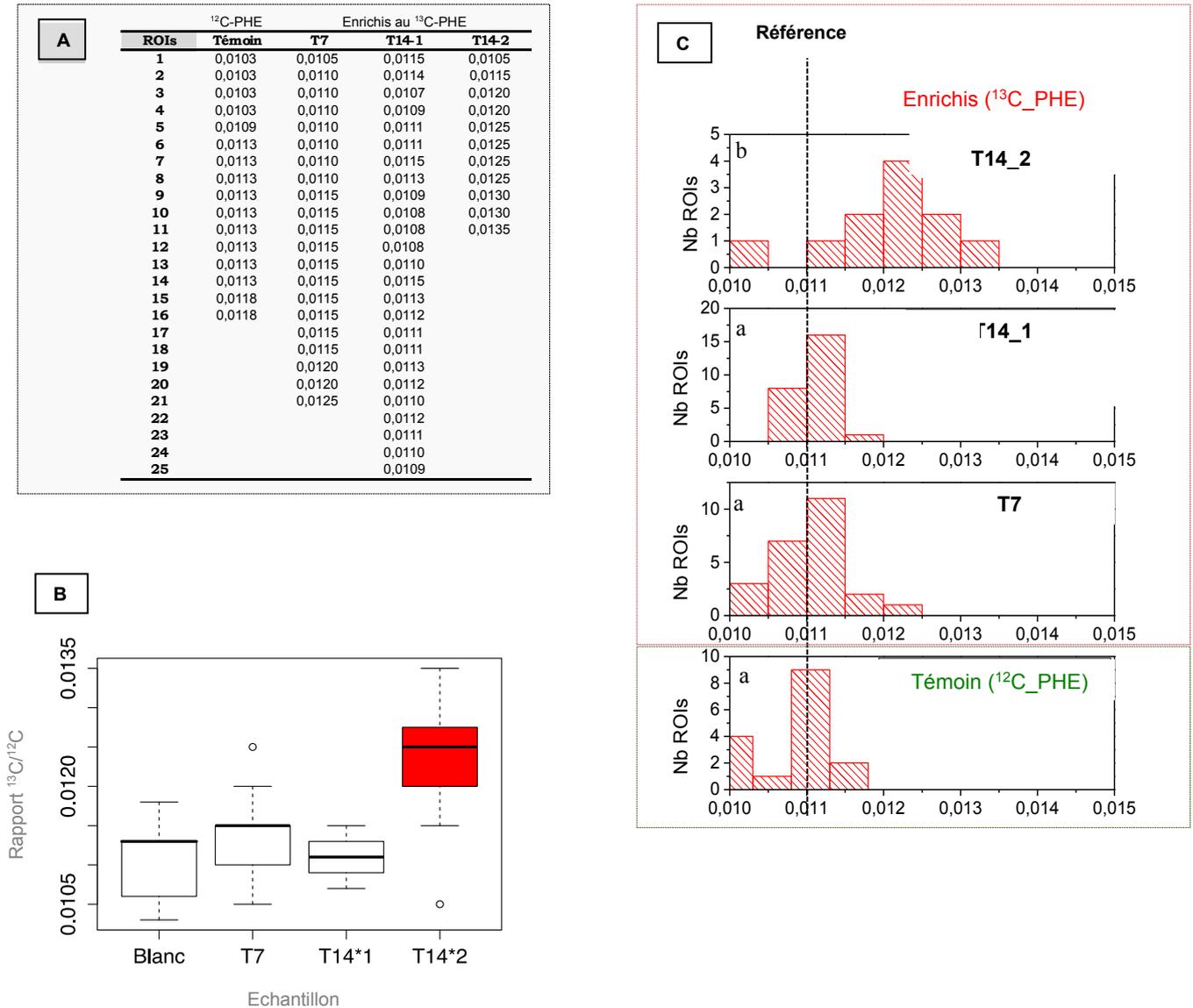
Les images composites (**Figure III-9**) mettent en évidence la co-localisation des ions secondaires  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ,  $^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^-$  et  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  suggérant une association entre MO et phases minérales. Toutefois la relation entre les ions  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  et  $^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^-$  semble plus accentuée, en effet sur l'image composite  $^{16}\text{O}^-$  et  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  certaines zones (entourées par des cercles blancs) indiquent un signal isolé des ions  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  (Figure 9c). De même qu'à certains endroits (cercle en trait noir), uniquement les ions  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  et  $^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^-$  sont co-localisés. La localisation d'un signal isolé en ions secondaires  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  permettrait de repérer des oxydes de fer. L'association des éléments O, Al et Fe constitutifs des minéraux argileux (Heister et al., 2011) avec le cluster CN suggère une association entre MO et minéraux argileux. Mais suivant le type d'argile les éléments peuvent varier, en effet les minéraux argileux ne sont pas systématiquement constitués d'O, d'Al et de Fe. Dans le sol étudié, les phases minérales argileuses identifiées par DRX sont la kaolinite ( $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ ), l'illite ( $(\text{K},\text{H}_3\text{O})(\text{Al},\text{Mg},\text{Fe})_2(\text{Si},\text{Al})_4\text{O}_{10}[(\text{OH})_2,(\text{H}_2\text{O})]$ ) et la smectite ( $(\text{Na},\text{Ca})_{0,3}(\text{Al},\text{Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) (Chapitre V). Les compositions élémentaires entre ces minéraux varient, l'illite seulement contient du Fe, de l'Al et de l'O. La kaolinite et la smectite sont composées d'Al et d'O entre autres. Les ions  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  et  $^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^-$  co-localisés sur les images (cercles noirs), pourraient indiquer des interactions entre de la MO et des argiles de type kaolinite et/ou smectite. Tandis que la co-localisation des ions  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ,  $^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^-$  et  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  laisse supposer des associations entre MO et

illite. Concernant les zones où le signal en ions secondaires  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  n'est pas juxtaposé avec les intensités des ions  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ,  $^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^-$ , on peut supposer la présence d'oxydes de fer non liés à la MO.

Les analyses en NanoSIMS apportent ainsi des informations sur la distribution élémentaire au sein des agrégats de sol à l'échelle micrométrique. Toutefois, elles n'ont pas permis de localiser l'isotope stable  $^{13}\text{C}$  issu du PHE étant donné qu'aucun enrichissement en  $^{13}\text{C}$  n'a été visualisé (à partir des images d'ions  $^{12}\text{C}^-$  et  $^{13}\text{C}^-$ ) dans les différents agrégats observés (T0, T7 et T14).

### 3.2. Enrichissement en $^{13}\text{C}$ de la racine et de son environnement proche.

Les valeurs moyennes de rapports isotopiques  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ont pu être calculées après les analyses en NanoSIMS à partir des ROIs définies par Winimage pour l'échantillon témoin ( $^{12}\text{C}$ -PHE) après 7 jours et les échantillons enrichis en  $^{13}\text{C}$ -PHE après 7 jours (T7) et 14 jours (pour deux échantillons distincts : T14\_1 et T14\_2) (**Tableau III-1**). Les valeurs  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  obtenues ont été normalisées par un facteur correctif ( $R_{\text{corr}} = \text{Ratio résine moyen du témoin} / \text{Ratio résine moyen de l'échantillon}$ ) et ont été répertoriées dans le tableau (**Figure III-10**).



**Figure III-10.** Valeurs des rapports isotopiques pour chaque ROI (A) déterminées sur les images NanoSIMS acquises pour les racines témoins (<sup>12</sup>C-PHE) et enrichies (<sup>13</sup>C-PHE) à 7 et à 14 jours. Les résultats sont présentés sous la forme d'une boîte à moustaches (B) ou d'histogrammes (C). Les différentes lettres (a, b) indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les échantillons.

La moyenne  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  calculée pour l'échantillon témoin ( $0,0111 \pm 0,001^a$ ) n'est pas significativement différente des valeurs moyennes obtenues pour les échantillons marqués à T7 ( $0,0114 \pm 0,0004^a$ ) et T14\_1 ( $0,0111 \pm 0,0002^a$ ). Mais elles sont significativement différentes de la moyenne calculée pour l'échantillon T14\_2 ( $0,0123 \pm 0,001^b$ ). Ces résultats permettent de mettre en évidence un enrichissement « global » en  $^{13}\text{C}$  dans l'échantillon T14\_2. Les 4 séries numériques de taille variable correspondant aux échantillons (témoin, T7, T14\_1 et T14\_2) sont visualisées sous la forme d'une boîte à moustaches (Figure 10B) et d'histogrammes permettant de visualiser et de mettre en évidence une différence significative entre l'échantillon T14\_2 (rouge) et les 3 autres échantillons (témoin, T7, T14\_1) non

significativement différents entre eux. Les zones balayées pour chaque échantillon sont aléatoires et prises seulement sur une partie de la racine puisqu'elle ne peut pas être analysée dans sa totalité. A 7 jours, aucun enrichissement n'est observé à partir des mesures en NanoSIMS. Cependant les valeurs de rapports isotopiques  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  mesurées en IRMS montrent un enrichissement « global » des racines après 7 et 14 jours (0,0115 et 0,0125 respectivement). Les différences observées entre les mesures en NanoSIMS et par IRMS peuvent s'expliquer par l'approche multi-échelle, en effet les mesures en NanoSIMS ont été effectuées sur des zones localisées dans le microenvironnement de la racine choisies aléatoirement alors que les mesures par IRMS ont été réalisées sur les racines entières.

Les travaux de Dupuy et al. (2016) et Wild et al. (2005) ont montré que le PHE n'était pas distribué de manière uniforme dans les racines de maïs mais sous la forme de patches ou « hotspots » dans certaines zones, essentiellement à proximité de l'exoderme (après 10 jours) et de l'endoderme (après 20 jours) (Dupuy et al., 2016). Les analyses en NanoSIMS paraissent ainsi plus adaptées pour prendre en compte l'hétérogénéité du contaminant dans les racines. Pour la suite, nous n'allons donc plus considérer l'ensemble des zones balayées par échantillon mais nous intéresser à chaque image acquise par zone analysée prise indépendamment, et uniquement pour les deux échantillons récoltés à 14 jours (T14\_1 et T14\_2) afin de voir si un enrichissement local est visible à l'échelle micrométrique.

### 3.3. Localisation du $^{13}\text{C}$ dans la « rhizosphère » à l'échelle micrométrique

En considérant l'ensemble des zones analysées pour chaque échantillon un enrichissement isotopique a été observé après 14 jours d'expérimentation mais est absent après 7 jours. Les images obtenues en NanoSIMS pour les différentes régions des échantillons T7 analysées ne seront pas présentées puisqu'aucun signal en  $^{13}\text{C}$  n'a été détecté. Nous allons donc nous focaliser sur les images en NanoSIMS acquises pour les échantillons de racines à 14 jours qui seront discutées ensuite. Les échantillons de racines fixés, enrobés et métallisés (Au) ont été analysés de manière aléatoire sur les zones polies.

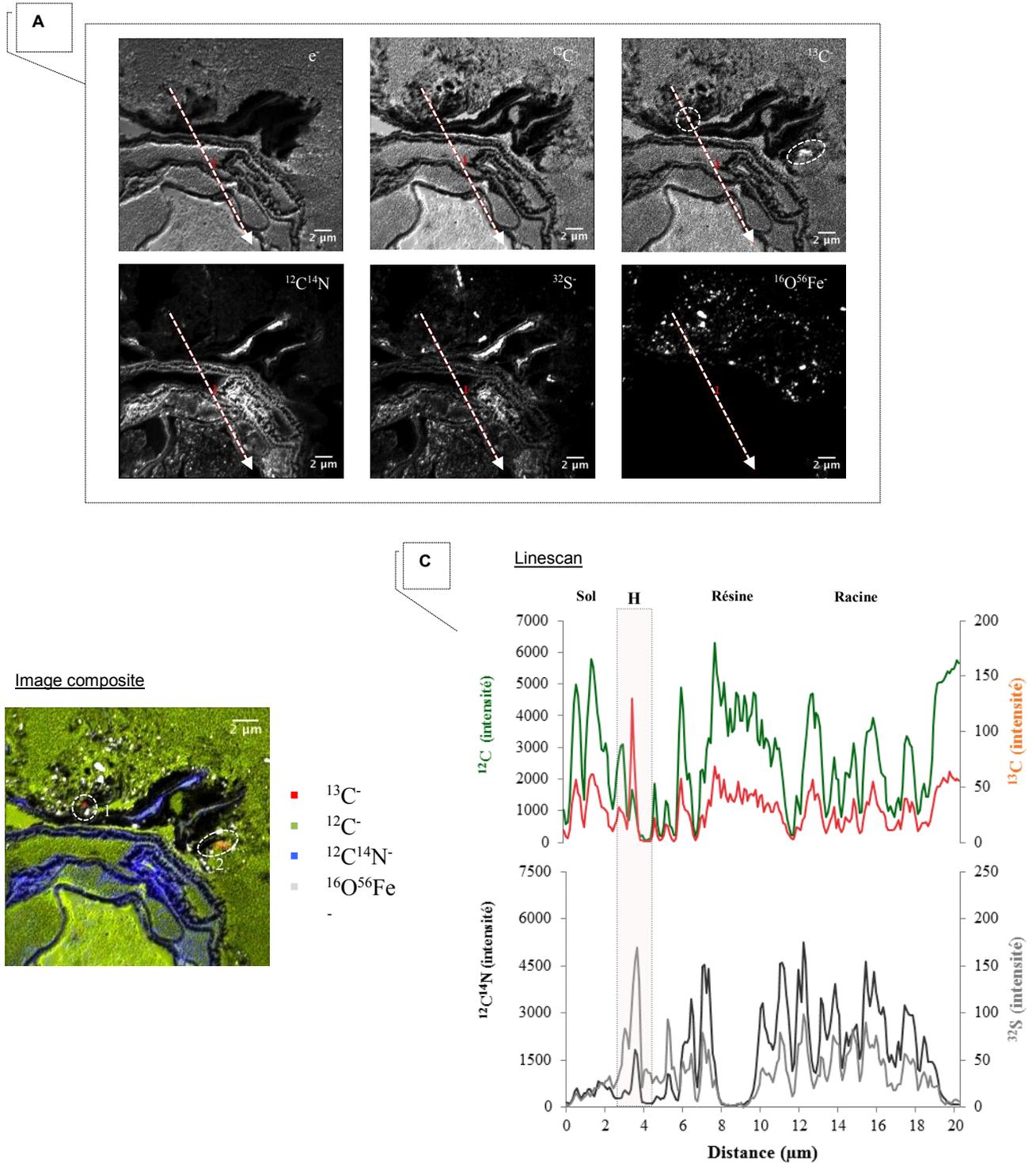
#### 3.3.1. Images NanoSIMS pour l'échantillon à 14 jours (T14\_1)

Les images obtenues en NanoSIMS (**Figure III-11**) montrent la distribution spatiale des espèces d'ions  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ,  $^{32}\text{S}^-$  et  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$  après pulvérisation d'une zone polie de l'échantillon T14\_1 par le faisceau d'ions  $\text{Cs}^+$ . La zone balayée fait  $25 \times 25 \mu\text{m}$  (soit  $256 \times 256$  pixels), le champ de vision est ainsi relativement restreint. Les différentes images (Figure

11A) permettent de localiser la racine avec les images  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ , et  $^{32}\text{S}^-$ . La distribution d'une partie des minéraux du sol est visualisée avec la carte des ions  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$  qu'on remarque autour du tissu racinaire. L'image des ions secondaires  $^{13}\text{C}^-$  met en évidence deux régions qui semblent enrichies en  $^{13}\text{C}$  (entourées sur l'image) puisqu'elles présentent une intensité élevée en  $^{13}\text{C}$ . Par des mesures directes et simultanées des isotopes  $^{12}\text{C}$  et  $^{13}\text{C}$ , l'analyse par NanoSIMS offre l'unique possibilité de déterminer les rapports isotopiques  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  dans la zone balayée (Li et al., 2008). Ces deux points chauds sont également visibles sur l'image composite obtenue par superposition des ions  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ , et  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$  (Figure 11B). Les tissus végétaux et les particules minérales sont aussi identifiables par les images  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  (bleu) et  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$  (blanc) respectivement. La résine est clairement visible grâce à l'image des ions secondaires  $^{12}\text{C}^-$  (vert).

Sur les images en NanoSIMS, un segment a été tracé au travers de l'image en passant par un des points chauds. Le linescan présente la distribution spatiale des ions secondaires  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ , et  $^{32}\text{S}^-$  le long du transect (indiqué par une flèche blanche sur l'image) d'environ 20  $\mu\text{m}$  et a été représentée graphiquement (Figure 11C). Le 1<sup>er</sup> graphique montre la distribution du  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^-$  le long du profil tandis que le 2<sup>ème</sup> met en évidence celle de  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  et  $^{32}\text{S}^-$ . Sur les graphiques, à partir de 3  $\mu\text{m}$  l'intensité du  $^{13}\text{C}$  augmente fortement et passe approximativement de 25 à 130 (nombre de coups/pixel) au même moment que celle du  $^{32}\text{S}^-$  qui double puis elles diminuent tout aussi fortement. Les rapports  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  et  $^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  évoluent au même moment le long du segment, cette région se distingue donc du reste de l'image. Elle coïncide avec le hotspot 1 (H) présent sur l'image composite (Figure 11B). Une co-localisation spatiale est donc identifiée entre les éléments  $^{13}\text{C}^-$  et  $^{32}\text{S}^-$ . L'ion  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  est également présent mais de façon moins intense que pour la racine (R) (Figure 11C). De même, l'intensité du  $^{32}\text{S}^-$  est moins forte dans le tissu racinaire. La zone H enrichie en  $^{13}\text{C}$  peut de ce fait être discriminée de la racine. Les régions où l'intensité des ions  $^{12}\text{C}^-$  est élevée et associée à un signal de faible intensité en ions  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  permettent de localiser la résine. L'élément  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}^-$  est intensément mesuré en début de segment (données non incluses) dans la zone « Sol » (Figure 11C) où l'intensité des ions  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  diminue fortement. Le rapport  $^{16}\text{O}^{56}\text{Fe}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  y est donc élevé ce qui n'est pas le cas pour les régions « Hotspots » et « Racine » (Figure 11C).

Echantillon de racines T14\_1



**Figure III-11.** Analyse et traitement des données de NanoSIMS pour l'échantillon (T14\_1). (A) Cartes des ions secondaires  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ,  $^{32}\text{S}^-$  et  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$  (B) Image composite issue de la superposition des images des ions  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  et  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$ . (C) Linescan représentant la distribution des éléments  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  et  $^{32}\text{S}$  le long du segment tracé sur les images.

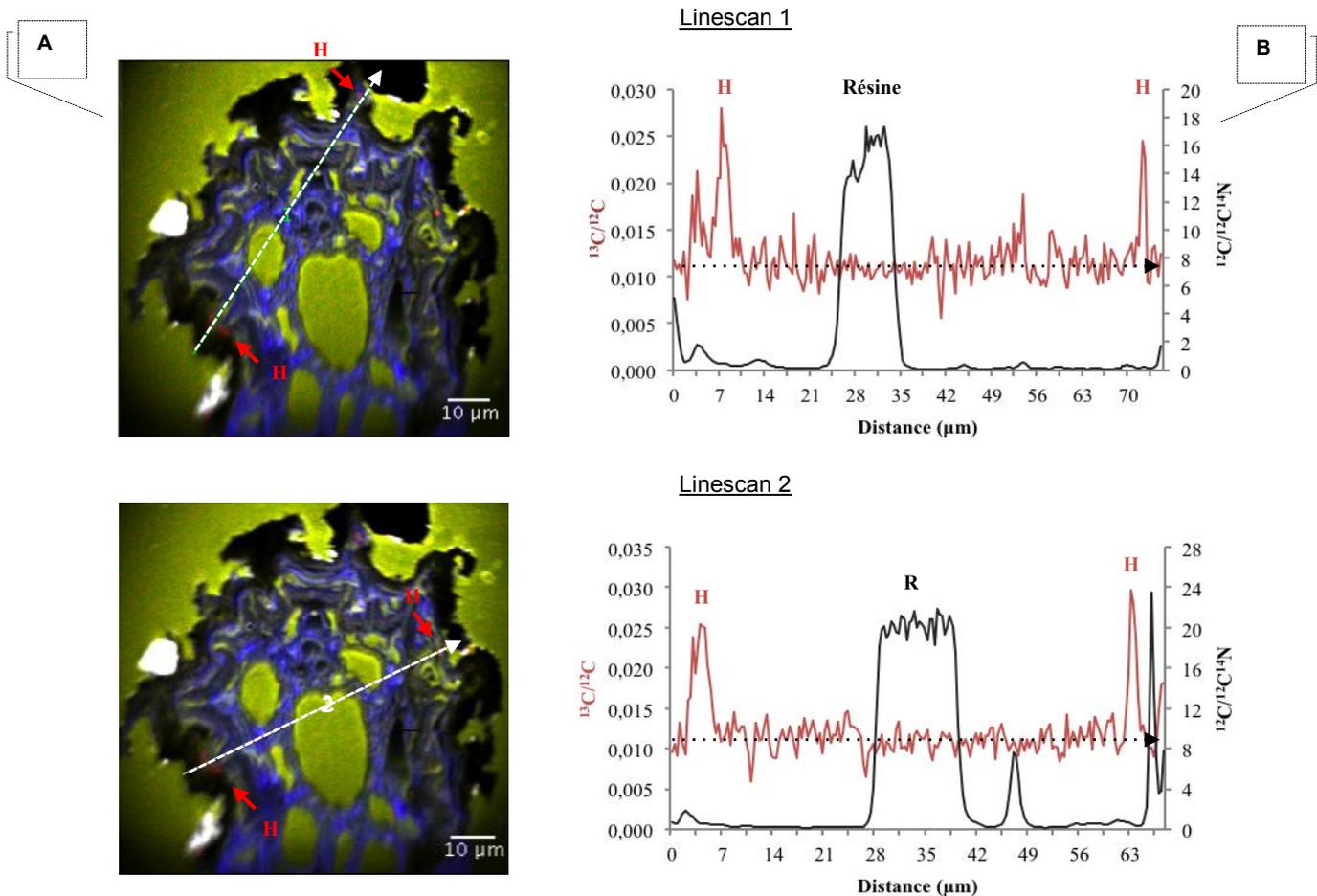
Ces résultats montrent qu'un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  issu du phénanthrène marqué est localisé à l'échelle micrométrique sur une des régions balayées pour l'échantillon T14\_1 malgré l'absence d'enrichissement « global » observé pour l'ensemble des zones analysées. Ce que l'on n'observe pas à 7 jours même après le traitement des images obtenues pour

chacune des zones analysées par NanoSIMS. Les mêmes traitements ont été réalisés pour les images de NanoSIMS obtenues pour l'échantillon « enrichi » à 14 jours (T14\_2) puisqu'un « enrichissement global » a été constaté d'après les résultats précédents (§3.2)

### 3.3.2. Images NanoSIMS pour l'échantillon de 14 jours (T14\_2)

Dans un premier temps, la zone analysée a été balayée sur un champ large donnant des images de taille  $90 \times 90 \mu\text{m}$  (**Figure III-12A**).

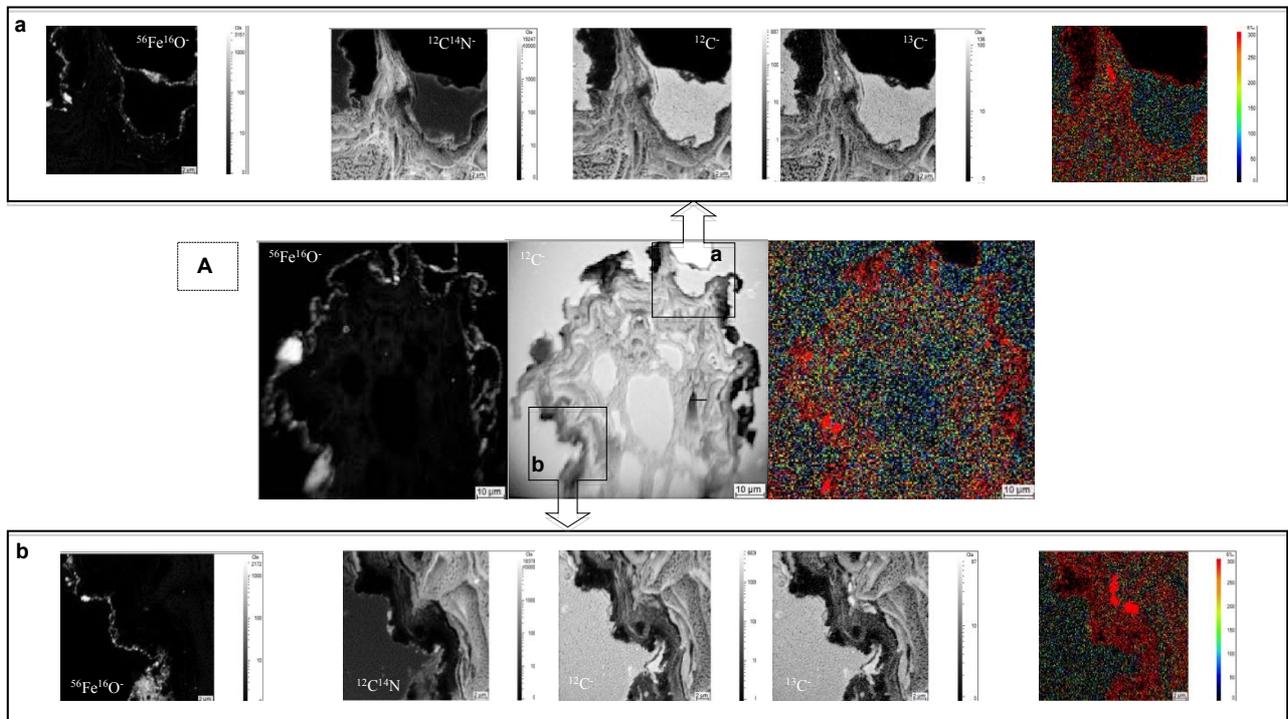
Echantillon racinaire T14\_2



**Figure III-12.** Images composites et linescans obtenus après traitement des images NanoSIMS  $90 \times 90 \mu\text{m}$  acquises pour l'échantillon T14\_2. L'image composite est présentée à deux reprises, afin d'afficher sur chacune un des deux linescans tracés (1 et 2). Les graphiques présentent la distribution des rapports isotopiques ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) et élémentaires ( $^{12}\text{C}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ ) le long des segments 1 et 2.

Les images composites obtenues après superposition des images d'ions secondaires  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  et  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$  ont permis de révéler la racine entière et de visualiser aisément des points chauds où le rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  est élevé (**Figure III-12A**). Des segments passant par ces hotspots (H) ont été tracés au travers des images (repérés par une flèche blanche). Les

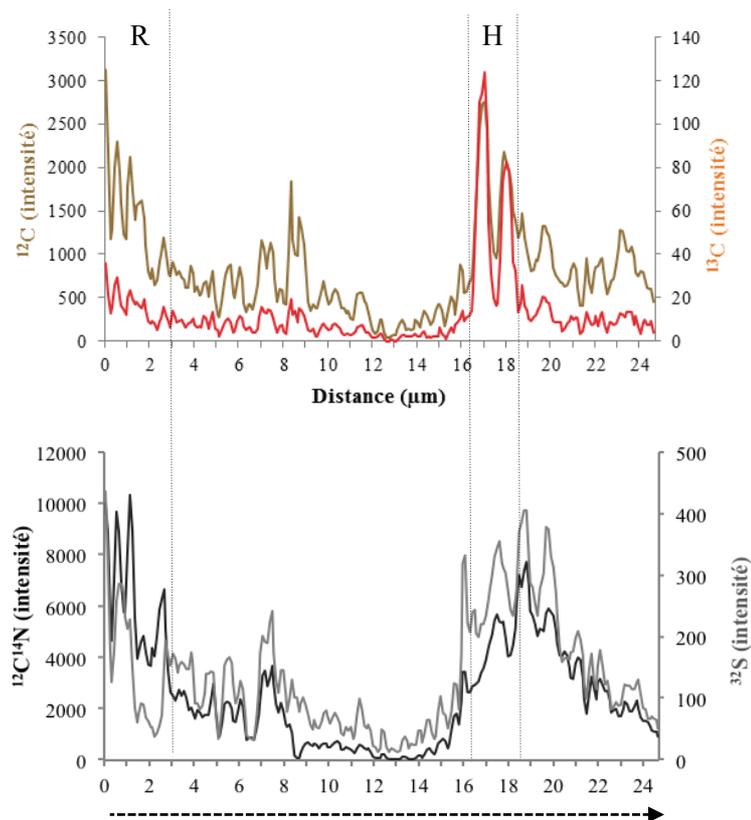
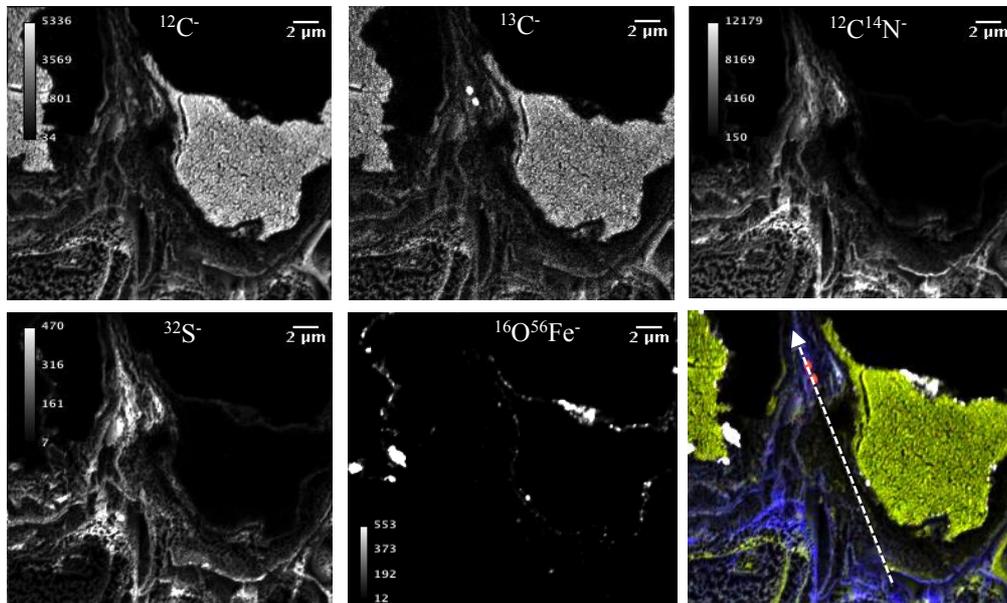
linescans 1 et 2 ont permis de représenter graphiquement la distribution des rapports isotopiques ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) et élémentaires ( $^{12}\text{C}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ ) le long des transects (**Figure III-12B**). Aux extrémités du segment, pour chaque linescan, les valeurs du rapport isotopique sont élevées ce qui indique un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  dans ces régions. Les zones présentant des abondances isotopiques plus importantes se retrouvent sur le pourtour de la racine et non à l'intérieur. Les régions où le signal du rapport élémentaire est élevé, permettent de localiser la résine (vert). Au voisinage de la racine, les particules de sol sont révélées par l'ion  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$  (blanc) (**Figure III-12A**). Les contours de la racine sont facilement discernables sur cette vue transversale, ainsi que les vaisseaux conducteurs (xylème et phloème). Il est à noter que les zones pour lesquelles aucun ion secondaire n'est détecté (noircies sur les images) correspondent à des zones arrachées (sans doute lors du polissage) constituées de vide (**Figure III-12A et 13A**).



**Figure III-13.** Cartes élémentaires acquises en NanoSIMS pour l'échantillon «enrichi» T14\_2. (A) Une large zone est d'abord balayée produisant des images de 90 X 90 µm. A partir de ces images rendant visible la racine entière (en vue transversale), certaines zones ont été zoomées pour donner des images à champ réduit de 25 X 25 µm (a et b).

A partir des hotspots localisés autour de la racine (**Figure III-12**), deux zones d'intérêt présentant un  $\delta^{13}\text{C}$  élevé ont été focalisées (**Figure III-13**). Un zoom est donc réalisé dans le but de se concentrer sur ces zones où le signal en  $^{13}\text{C}$  détecté est important et de localiser plus précisément les régions enrichies. Les zones balayées sur l'image ont été réduites pour donner des images de 25 x 25 µm. Sur les images des rapports isotopiques produites à partir des images des ions secondaires  $^{12}\text{C}^-$  et  $^{13}\text{C}^-$  les valeurs hautes de  $\delta^{13}\text{C}$  sont bien visibles et

localisées. Les images issues de la zone « a » vont être décrites (**Figure III-14**), les images acquises à partir de la zone « b » feront l'objet du chapitre suivant (IV).

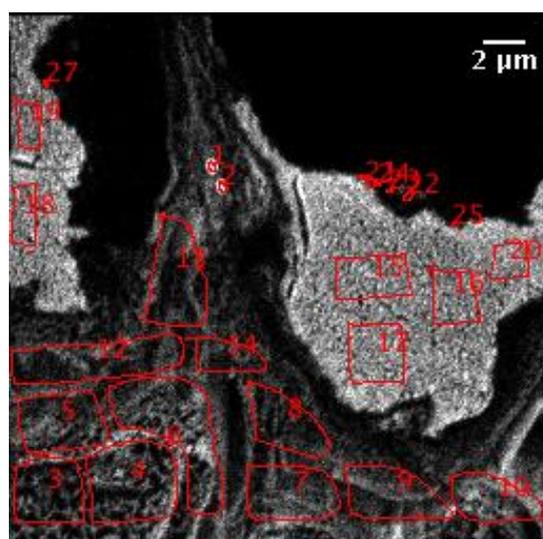


**Figure III-14.** Images NanoSIMS et linescans obtenues après balayage de la zone a (Figure III-13a).

Les images obtenues par NanoSIMS après le scan de la zone a (**Figure III-13**) sont présentées dans la **Figure III-14**. Le long du segment tracé sur l'image composite (flèche

blanche) les profils d'intensité pour les éléments  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^-$ ,  $^{32}\text{S}^-$ , et  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  sont observés. La distribution des éléments dans chaque cas est hétérogène, avec une zone notable localisée à 16-20  $\mu\text{m}$  sur le segment. Une incorporation du  $^{13}\text{C}$  est remarquable par les « deux pics » (correspondant aux deux hotspots apparents sur l'image composite) où l'intensité de comptage du  $^{13}\text{C}^-$  est élevée et corrélée avec des intensités élevées de l'ion  $^{32}\text{S}^-$ . Les ions  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  et  $^{12}\text{C}^-$  sont toujours détectés à cet endroit, et le fait de les retrouver co-localisés montre qu'il s'agit de matériel biologique, mais le rapport  $^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  diffère de la zone identifiant la racine (R).

Les cellules végétales (racine) ont été identifiées à l'aide des images élémentaires obtenues pour les ions secondaires  $^{12}\text{C}^-$  et  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  que l'on arrive clairement à co-localiser. L'image de l'ion secondaire  $^{32}\text{S}^-$  est obtenue pour localiser la biomasse contenant des protéines (Kertesz and Mirleau, 2004; Li et al., 2008). Pour compléter l'identification de ces hotspots des ROIs ont été déterminées et subdivisées en 4 groupes de classe (§2.2.1) suivant leur ressemblance chimique (élémentaire et isotopique) (**Figure III-15**).



	$^{12}\text{C}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$	$^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$	$^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}/^{12}\text{C}$
<b>Hotspot</b>	$0,65 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
<b>Racine</b>	$0,33 \pm 0,07$	$0,03 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
<b>Minéral</b>	$1,75 \pm 0,39$	$0,42 \pm 0,35$	$4,55 \pm 3,93$
<b>Résine</b>	$26,19 \pm 6,04$	$0,04 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,00$

**Figure III-15.** ROIs et valeurs des rapports élémentaires associés pour chaque classe de ROIs déterminée : Hotspot, Racine, Minéral et Résine.

L'identification de ces zones enrichies est complexe. Les images ne permettent pas à elles seules de les discriminer mais d'après la taille et la nature des éléments détectés ces deux

hostspots pourraient correspondre à des bactéries. Des résultats similaires ont été obtenus pour la zone correspondant aux images de la Figure III-13b et sont discutés dans le **Chapitre IV**.

En effet, les bactéries adaptées à la pollution aux HAP sont capables de dégrader le polluant marqué et peuvent alors l'incorporer en partie dans leur métabolisme. Les microorganismes sont capables d'utiliser les HAP comme source de C via des voies métaboliques spécifiques et il a été montré que les bactéries peuvent transformer ou dégrader des HAP (Cerniglia, 1993; Pothuluri and Cerniglia, 1994) et notamment des HAP de 2 à 4 cycles (Kanaly and Harayama, 2000). De nombreux microorganismes sont capables de métaboliser des HAP à 3 cycles (Dean-ross et al., 2001) tel que le PHE.

Dans une précédente étude, Corgié et al. (2003) ont montré l'existence d'un gradient de densité bactérienne en fonction de la distance aux racines, avec un nombre plus important de bactéries, dont des bactéries dégradantes, au plus proche des racines. Cependant, la probabilité de les observer en utilisant la NanoSIMS est faible. En effet, les zones de balayage imposées par l'appareil sont limitées. De plus, la fréquence d'éventuelles bactéries enrichies au  $^{13}\text{C}$  est faible, il y a donc peu de chance de les observer. Pour confirmer la présence de bactéries dégradantes enrichies en  $^{13}\text{C}$ , il faudrait procéder à l'analyse de la totalité de la surface échantillonnée.

#### 4. Conclusion

L'objectif de ces analyses à microéchelle a été de localiser précisément le carbone 13 issu du PHE dans les microenvironnements du sol et de la rhizosphère. Au cours de cette étude, un enrichissement a été observé mais n'a pas été visible partout, c'est le cas pour les agrégats de sol. Pour les racines, au contraire, les images  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  indiquent la présence de points chauds fortement enrichis en  $^{13}\text{C}$  entourant les racines (et même dans l'épiderme ou rhizoderme). Plusieurs hotspots ont été identifiés après 14 jours d'expérimentation mais ne sont pas observables après 7 jours. Malgré tout, en regard des mesures de carbone isotopique dans les racines obtenues par IRMS ou par NanoSIMS, des différences sont perceptibles. Les résultats obtenus par IRMS montrent un enrichissement en carbone 13 ( $\text{E}^{13}\text{C}$ ) d'environ 0,05 % ( $\text{R}^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 0,0115$ ) dans les tissus racinaires après 7 jours d'expérimentation et de 0,14 % ( $\text{R}^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 0,0125$ ) approximativement après 14 jours. L'excès en  $^{13}\text{C}$  est moins marqué après 7 jours d'expérimentation, toutefois il est bien présent dans les racines. Le  $^{13}\text{C}$ -PHE ou

les  $^{13}\text{C}$ -métabolites ont pu être adsorbés sur la racine ou absorbés pour se retrouver dans les tissus.

L'analyse par NanoSIMS ne permet pas d'être exhaustif, puisque seulement une fraction du matériel biologique est analysée. Les résultats obtenus après analyses par NanoSIMS n'ont pas montré d'enrichissement significatif à 7 jours, néanmoins il est observé après 14 jours par cette technique (**Figure III-12 à 15**). A partir du traitement de ces images, il a été observé qu'au niveau des régions enrichies, les valeurs élevées en  $^{13}\text{C}$  ont été à chaque fois co-localisées avec le  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  mais aussi avec le  $^{32}\text{S}^-$ . Le rapport de ces deux éléments  $^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  augmente au niveau des hotspots, par rapport aux autres classes identifiées sur l'image comme la racine qui présente un rapport  $^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  moins élevé (**Figure III-15**). La distribution de protéines peut être observée par les images indiquant l'intensité des ions  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  (indicateur de biomasse en co-localisation avec l'ion  $^{12}\text{C}^-$ ) et l'espèce d'ion  $^{32}\text{S}^-$ .

Les différentes informations tirées de ces résultats suggèrent que les hotspots peuvent correspondre à des bactéries, cependant cette hypothèse sera discutée de manière plus approfondie dans le chapitre suivant (IV).

Cependant, les analyses NanoSIMS n'ont pas permis d'observer de points chauds dans les agrégats de sol, ce qui pourrait être inhérent à la préparation des échantillons de sol.

Pour aller plus loin et identifier les différentes caractéristiques ultra-structurales du matériel biologique présent et le compartiment dans lequel est retrouvé le composé marqué, d'autres techniques pourraient être utilisées en complément de la NanoSIMS comme la microscopie électronique à transmission (MET) (Carpenter et al., 2013). Des techniques complémentaires sont couramment utilisées pour appuyer et confirmer les résultats souvent insuffisants obtenus par NanoSIMS. Dans notre cas, il n'a pas été possible de combiner MET et NanoSIMS puisque les échantillons produits n'étaient pas adaptés à des observations nécessitant des lames fines.

Pour les agrégats de sol, des méthodes comme la technique de fractionnement par densimétrie pourraient être utilisées dans ce genre d'étude. En effet, elle permet de désagréger le sol et d'obtenir différentes fractions qui pourraient être observées individuellement en NanoSIMS (Hatton et al., 2015). La préparation serait moins laborieuse, le carbone marqué moins dilué et pourrait être localisé plus précisément dans les différents complexes organo-minéraux extraits.

**Chapitre IV. Dynamique des  
HAP et des composés organiques  
dérivés dans un mésocosme sol-  
plante contaminé au  $^{13}\text{C}$ -  
phénanthrène.**



Les HAP sont des contaminants ubiquitaires et persistants dans l'environnement, qui représentent un risque pour la santé humaine et écosystémique. Le devenir et le comportement des HAP dans les sols, en présence ou non de plante, ont été largement étudiés au cours de ces dernières années. Dans les sols, les HAP sont soumis à de nombreux mécanismes tels que la sorption, et la biodégradation qui sont considérés comme étant les processus dominants dans la dynamique des HAP (Magee et al., 1991). Mais, la plante peut aussi jouer un rôle essentiel dans la dissipation des HAP dans les sols contaminés. Un effet direct des plantes peut être observé par adsorption et/ou absorption des polluants et métabolites associés sur/dans les tissus végétaux mais qui semble limité (Gao and Zhu, 2004; Günther et al., 1996; Rezek et al., 2008). Mais l'effet le plus significatif est indirect via la stimulation de l'activité microbienne de biodégradation dans la rhizosphère. En effet, la rhizosphère des plantes est connue comme étant un environnement favorable pour le développement d'une microflore active et abondante pouvant améliorer la dissipation des HAP dans les sols (Corgié et al., 2003 ; Reilley et al. 1996). Dans le sol, une partie des HAP et des métabolites associés peuvent persister dans la matrice sous forme de résidus liés. Cependant, les composés formant ce résidu non extractible (Cébron et al., 2011) sont encore mal connus et cette fraction résiduelle du sol nécessite d'être davantage étudiée. Le carbone issu des HAP formant le résidu lié peut être : (i) minéralisé sous forme de CO<sub>2</sub>, (ii) biodégradé ou biotransformé pour former des métabolites de dégradation généralement plus réactifs que les composés parents se liant de ce fait plus facilement aux constituants du sol ou (iii) incorporé dans la biomasse microbienne (Kästner et al., 1999).

L'objectif de ce chapitre était d'étudier l'influence de la plante sur le devenir des HAP et des composés organiques issus de leur transformation et plus précisément sur leur répartition dans les différents compartiments du sol et de la rhizosphère. Pour cela, une expérience en mésocosmes (Chapitre II) a été réalisée sur 21 jours avec du ray-grass et un sol qui a été artificiellement contaminé par un HAP modèle marqué au carbone 13, le <sup>13</sup>C-phénanthrène. Les analyses ont porté sur le C issu du <sup>13</sup>C-PHE ajouté dans le sol planté ou non en suivant (i) sa distribution dans la fraction extractible et la fraction non extractible du sol, et dans la plante mais aussi (ii) la localisation du <sup>13</sup>C dans le sol et la rhizosphère à une échelle globale et à une échelle plus fine, en combinant des outils d'IRMS et de NanoSIMS.

A 21 jours, environ 90% de la quantité extractible de PHE a été dissipée, en revanche aucun effet de la rhizosphère sur la dissipation du PHE n'a été mis en évidence. Plus de 40% du <sup>13</sup>C issu du <sup>13</sup>C-PHE est encore présent dans le sol à la fin de l'expérimentation, probablement plus sous la forme du composé parent mais sous la forme de produits issus de

leur transformation. Par conséquent, ils peuvent être sous la forme de métabolites ou incorporés dans la biomasse microbienne. Approximativement 0,36% du  $^{13}\text{C}$ -PHE initialement ajouté a été retrouvé dans les racines et parties aériennes, représentant un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  ( $E^{13}\text{C}$ ) équivalent à celui retrouvé dans le sol ( $E^{13}\text{C} \approx 0.04 \%$  at.).

L'utilisation de la NanoSIMS a permis de localiser le  $^{13}\text{C}$  dans les racines et son environnement proche à l'échelle micrométrique. Un enrichissement global a été confirmé par les résultats IRMS. Plusieurs hotspots enrichis en  $^{13}\text{C}$  ont été identifiés, associés à un rapport  $^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  élevé. En comparant leur composition élémentaire, leur taille et leur forme il a été supposé que ces hotspots pouvaient être des bactéries.

## **Dynamics of PAHs and derived organic compounds in a soil-plant mesocosm spiked with $^{13}\text{C}$ -phenanthrene.**

Johanne Cennerazzo<sup>a,b</sup>, Alexis de Junet<sup>a,b</sup>, Jean-Nicolas Audinot<sup>c</sup>, Corinne Leyval<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>*Université de Lorraine, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, UMR 7360, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France*

<sup>b</sup>*CNRS, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, UMR 7360, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France*

<sup>c</sup> *Advanced Instrumentation for Ion Nano-Analytics, Materials Research and Technology Department, Luxembourg Institute of Science and Technology, 41 rue du Brill, L-4422, Luxembourg*

### **Abstract**

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous and persistent soil pollutants. Their fate and the influence of the plant rhizosphere on their dynamics has been extensively studied, but studies mainly focused on their dissipation rate. We conducted a plant-soil mesocosm experiment to study the fate and distribution of PAHs or derived compounds in the extractable fraction, the residual soil, the shoot biomass and the root biomass. The experiment was conducted for 21 days using ryegrass and a forest soil spiked with  $^{13}\text{C}$ -labeled phenanthrene (PHE), using combined IRMS and NanoSIMS for analyses. Almost 90% of the initial extractable PHE content was dissipated within 3 weeks, but no rhizospheric effect was highlighted on PHE dissipation. More than 40% of  $^{13}\text{C}$ -PHE was still in the soil at the end of the experiment, but not as PHE or PAH-derived compounds. Therefore it was under the form of new compounds (metabolites) and/or had been incorporated into the microbial biomass. About 0.36% of the initial  $^{13}\text{C}$ -PHE was recovered in the root and shoot tissues, representing similar  $^{13}\text{C}$  enrichment ( $E^{13}\text{C}$ ) as in the soil ( $E^{13}\text{C} \approx 0.04$  at.%). Using NanoSIMS,  $^{13}\text{C}$  was also localized at the microscale in the roots and their close environment. Global  $^{13}\text{C}$  enrichment confirmed the results obtained by IRMS. Some hotspots of  $^{13}\text{C}$  enrichment were found, with a high  $^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  ratio. Comparing the ratios, sizes and shapes of these hotspots suggested that they could be bacteria.

**Keywords:** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; <sup>13</sup>C-Phenanthrene; soil; rhizosphere; IRMS; NanoSIMS

**Highlights:**

- A mesocosm experiment with <sup>13</sup>C-PHE-spiked soil was analyzed by IRMS and NanoSIMS
- 40% of <sup>13</sup>C-PHE was still in the soil after 21 days but not as the parent compound
- Bacterium-like <sup>13</sup>C-enriched hotspots were revealed by NanoSIMS close to the roots

## 1. Introduction

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous and persistent organic compounds found in the soils of large brownfield areas in many former industrial regions. They are composed of two or more benzene rings and result from the incomplete combustion by pyrolysis of organic materials from natural or anthropogenic sources (Edwards, 1983). They are persistent in soils due to their low water solubility and high adsorption on soil constituents (Wilson and Jones, 1993). They are harmful to human and environmental health, and 16 of them are listed as priority pollutants by the USEPA (Hartmann, 1996).

Many studies have addressed the fate and dynamics of PAHs in soils, where they can undergo numerous processes such as plant uptake, stabilization by sorption on organic and mineral phases, or transformation and degradation until total mineralization. Sorption and degradation are key processes in the fate of PAHs in the environment (Magee et al., 1991). The persistence of organic pollutants in soils has been attributed to sequestration mechanisms including intra-organic matter and intra-particle diffusion of the parent compound and transformation products (Doick et al., 2005). Plants seem to have a limited direct impact on PAH dynamics in polluted soils (Fang et al., 2001; Günther et al., 1996; Rezek et al., 2008). Gao and Zhu (2004) showed that uptake of phenanthrene and pyrene by plants accounted for less than 0.01 and 0.23% of enhanced loss in vegetated versus non-vegetated soils. The low water solubility of PAHs could prevent significant uptake by plant tissues (Binet et al., 2000; Kipopoulou et al., 1999) and root-to-shoot translocation (Burken and Schnoor, 1998). However, the indirect role of plants in PAH dynamics through their root systems is largely

documented (Rezek et al., 2008; Miya and Firestone, 2000; Liste and Alexander, 2000). The plant rhizosphere is a favorable environment for high microbial diversity and activity, which permit higher PAH dissipation in soils (Corgié et al., 2003; Anderson et al., 1993; Schwab, 1994; Reilley et al. 1996). The main mechanisms involved in PAH dissipation in the soil and the rhizosphere are biodegradation and biotransformation by an active microflora (Binet et al., 2000; Wilson and Jones 1993; Cerniglia, 1997). The soil heterotrophic microflora may use organic pollutants as a source of carbon (C) and energy to grow, or for co-metabolism (Hwang and Cutright, 2002). The C derived from PAHs (C-PAH) could be (i) incorporated into the microbial biomass (Kästner et al., 1999), and/or (ii) transformed into other organic compounds and thus form part of non-extractable PAHs (Richnow et al., 1998 and 1999). The newly formed organic products could be more reactive than the parent compounds and therefore bind with soil components more easily, but could also be more toxic (Sabaté et al., 2006). Cébron et al. (2011) showed that 38% of the  $^{13}\text{C}$  from labeled PAH added into soil mesocosms was not extractable after 12 days. C-PAH was still present but probably not under the form of parent PAHs or extractable compounds. Some of these newly formed organic compounds may be more soluble and more mobile than parent PAHs (Sabaté et al., 2006). However, most of the studies led so far only considered the dissipation of PAHs in the soil and in the plant rhizosphere. Some studies focused on the residual and newly formed organic compounds, especially on the distribution and the dynamics of C-PAH in the soil (Doick et al., 2005; Eschenbach et al., 1998; Kästner et al., 1999a; Macleod and Semple, 2003; Grant L Northcott and Jones, 2001; Richnow et al., 1998), but no in soil-plant-microflora compartments.

An effective and relevant way to trace carbon compounds in soil-plant ecosystems is to use  $^{13}\text{C}$  isotopic labeling. For example, Richnow et al. (2000, 1998) used [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]-PAH to trace the transformation of phenanthrene in a soil reactor. But it appears more relevant to monitor C-PAH using a molecule labeled on all its carbon atoms (Cébron et al., 2011). Another complementary method to trace a labeled organic compound in soils, plants or bacteria is to map isotopic distribution at a microscale through NanoSIMS analyses (high-resolution imaging Secondary Ion Mass Spectrometry) (Hoppe et al., 2013). NanoSIMS analyses can map all the elements (isotopes) of the periodic table with an ultimate lateral resolution (probe size) in the 50 to 150 nm range, high sensitivity (a few ppm), and high mass resolution (Herrmann et al., 2007; Moore et al., 2012; Remusat et al., 2012; Vidal et al., 2016).

The objective of our study was to investigate the fate of C-PAH in planted and non-planted soil by assessing (i) the distribution of C-PAH in the extractable fraction, the residual soil, the shoot biomass and the root biomass, and (ii) the localization of C-PAH in different compartments of the soil-plant system. We conducted a mesocosm trial using ryegrass,  $^{13}\text{C}$ -phenanthrene ( $^{13}\text{C}$ -labeled on all its carbon atoms) soil spiking, and coupling isotopic analyses with NanoSIMS analyses.

## 2. Materials & methods

### 2.1. Soil-plant mesocosms

Planted and non-planted mesocosms were set up, with soil spiked with either unlabeled  $^{12}\text{C}$ -PHE (control) or labeled  $^{13}\text{C}$ -PHE. The soil was a Calcisol, sampled at 5-35 cm depth in a temperate beech forest close to a former coking plant (49°14.163'N, 6°0.116'E, Homecourt, Lorraine region, France). The soil horizon had a  $\text{pH}_{\text{water}}$  of 7.3; it contained 48% clay, 44% silt, 7% sand, had organic carbon and total nitrogen contents of 23.0 and 1.62  $\text{g kg}^{-1}$  respectively, and a low PAH content (13.4  $\text{mg kg}^{-1}$ ). The soil sample was air-dried, ground and sieved to 2 mm, and then spiked with 300 mg PHE  $\text{kg}^{-1}$  of soil. Spiking modalities were as follows: one with unlabeled PHE ( $^{12}\text{C}$ -PHE, Sigma Aldrich >97%) and two with known  $^{13}\text{C}$ -PHE/ $^{12}\text{C}$ -PHE mixtures ( $^{13}\text{C}$ -PHE, Sigma-Aldrich Isotec Stables Isotopes, Miamisburg, Ohio, USA). The  $^{13}\text{C}$ -PHE/ $^{12}\text{C}$ -PHE ratio was 1:8 for organic carbon analyses and 1:1 for NanoSIMS analyses. A PHE-hexane solution was added to 1:10 of the total soil mass for spiking. Hexane was evaporated under a fumehood, and then the spiked soil was homogenized with the remaining 9:10 of soil mass.

The planted and non-planted mesocosms were conducted in 50-mL glass jars with 40 g of PHE-spiked soil. They were inoculated with 10 mL of soil suspension from a PAH-contaminated soil (200  $\text{g L}^{-1}$  in 0.85% NaCl) to ensure that a PAH-degrading microflora was present. Five ryegrass (*Lolium perenne*) seeds were added in each planted mesocosm. The experiment was conducted in a growth chamber under controlled conditions (22°C/18°C with 16h/8h day/night, 250  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 80% relative humidity) for 21 days. Four replicates were prepared for each planted and non-planted modality and each sampling time (0, 7, 14 and 21 days), and for each  $^{12}\text{C}$ -PHE- and  $^{13}\text{C}$ -PHE/ $^{12}\text{C}$ -PHE- (1:8 ratio) spiked soil, except for 1:1  $^{13}\text{C}$ -PHE/ $^{12}\text{C}$ -PHE-spiked soil (one replicate, and sampling after 7 and 14 days

for NanoSIMS microprobe analyses). At each sampling time, ryegrass shoots and roots were removed from the soil and separated. The roots were washed with distilled water and dried with filter paper. The fresh plant material and soil were oven-dried at 35 °C and then ground, and the soil was sieved to 200 µm prior to analyses. The roots were prepared directly after sampling for elemental mapping analyses.

## 2.2. Organic and isotopic analyses

PHE was extracted from 2 g of dry soil using dichloromethane (DCM) and a high-pressure and high-temperature DIONEX<sup>®</sup> 200 ASE (Accelerated Solvent Extractor) automated extractor. Residual soil (after PAH extraction) was kept for organic analyses. DCM was evaporated from the PAH extracts under N<sub>2</sub> flow and replaced by acetonitrile for PAH analysis. PAH extracts were analyzed using a reverse-phase chromatography UHPLC Ultimate 3000 RSLC system (Dionex) equipped with a Diode Array Detector and a Zorbax Eclipse PAH RRHD column (100 mm x 2.1 mm, 1.8 µm – Agilent). The mobile phase was a mixture of water/acetonitrile in gradient mode, with a flow rate of 0.420 mL min<sup>-1</sup>. The wavelength used for detection was 254 nm.

Isotopic and elemental analyses were performed on bulk and residual soil (before and after PAH extraction, respectively), and on ryegrass shoot and root biomass using EA-GC/IRMS (Elementary analyzer – Isotope Ratio Mass Spectrometry 100, IsoPrime, Manchester. EA: IsotopeCube, Elementar, Hanau). Approximately 1.0 mg of the powdered material of each sample was weighed and placed in 6x4 mm tin capsules (Elemental Microanalysis Limited, Devon, UK). Analyses were carried out at the Technical Platform of Functional Ecology (OC 081) at the INRA Forest Ecology and Eco-Physiology Unit. Isotopic measurements were reported in the delta notation (δ expressed in ‰) as:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left( \frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{ref}}} \right) - 1 \times 1000 \quad \text{Eq. 1}$$

Where  $R_{\text{sample}} = {}^{13}\text{C}_{\text{sample}}/{}^{12}\text{C}_{\text{sample}}$  for labeled and control samples, and  $R_{\text{ref}}$  refers to the Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) standard, with  $R_{\text{ref}} = {}^{13}\text{C}_{\text{PDB}}/{}^{12}\text{C}_{\text{PDB}} = 0.0112375$ .

Enrichment in <sup>13</sup>C (E<sup>13</sup>C), expressed as excess % of atoms (at.%), was calculated relatively to the unlabeled control in the soil and in the plant, as follows:

$$E^{13}\text{C} (\text{at.}\%) = ({}^{13}\text{C}_{\text{labeled}} - {}^{13}\text{C}_{\text{control}}) \quad \text{Eq. 2}$$

Where  ${}^{13}\text{C}_{\text{labeled}} (\text{at.}\%) = [\text{R}_{\text{labeled}}/(\text{R}_{\text{labeled}} + 1)] \times 100$ ,  ${}^{13}\text{C}_{\text{control}} (\text{at.}\%) = [\text{R}_{\text{control}}/(\text{R}_{\text{control}} + 1)] \times 100$ .  $E^{13}\text{C}$  was calculated for bulk soil, residual soil, and ryegrass shoot biomass and root biomass.

Soil and plant  ${}^{13}\text{C}$  concentrations ( ${}^{13}\text{C}_{\text{conc}}$ ) were also calculated (expressed as  $\mu\text{g C g}^{-1}$  of soil and  $\mu\text{g C g}^{-1}$  of plant, respectively):

$${}^{13}\text{C}_{\text{conc}} (\mu\text{g C g}^{-1}) = \left( \frac{{}^{13}\text{C}_{\text{labeled}} - {}^{13}\text{C}_{\text{control}}}{100} \right) \times C_x \quad \text{Eq. 3}$$

Where  $C_x$  refers to the C content, expressed in  $\mu\text{g C g}^{-1}$  of soil or plant.  ${}^{13}\text{C}$  distribution (%) in the mesocosms was deduced from the  ${}^{13}\text{C}$  concentrations and by considering that the percentage of  ${}^{13}\text{C}$  initially added in the soil after PHE-spiking was 100% (T0).  ${}^{13}\text{C}$  distribution (%) was calculated for the PAH extracts, the residual soil and the plants. The remaining  ${}^{13}\text{C}$  was considered as  ${}^{13}\text{C}$  loss.

### 2.3. Elemental mapping analyses in the roots

The fresh ryegrass roots harvested after 7 and 14 days were rapidly cut into 0.5-cm pieces and placed on adhesive film. The fine roots were cryofixed using a LEICA EM CPC Universal Cryoworkstation. They were frozen at atmospheric pressure ( $10^5 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$ ), and slammed on copper mirrors (Printz et al., 2016). Then the cryofixed samples were lyophilized (LEICA EM CFD) without using any solvent ( $1^\circ\text{C h}^{-1}$  for 8 days down to  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  at  $1.10^{-4} \text{ Pa}$ ) (Printz et al., 2016). The root samples were finally embedded in Epoxy resin and coated with gold prior to analyses by nano Secondary Ion Mass Spectrometry.

Elemental mapping was performed using a Cameca NanoSIMS 50 ion probe (Gennevilliers, France) in the raster-imaging mode. The probe detects the secondary ions generated from each pulverized sample surface by an energetic incident ion beam (Hoppe et al., 2013). Ion images were obtained using a beam of  $\text{Cs}^+$  primary ions with an energy impact of 16 keV and a beam current of 0.8 pA on the sample. The images were recorded in 256x256 pixels; under these conditions, a lateral resolution of 80-100 nm was expected. Negative secondary ion signals for  ${}^{12}\text{C}^-$ ,  ${}^{13}\text{C}^-$ ,  ${}^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ,  ${}^{32}\text{S}^-$  ions and  ${}^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ,  ${}^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$  clusters (Behrens et al., 2008) were collected simultaneously using the multicollection system. Images were acquired with a counting time of 30 ms/pixel. Mass resolution ( $M/\Delta M$ ) was above 4500 (e.g. 2 916 was required to resolve mass interference between  ${}^{13}\text{C}$  and  ${}^{12}\text{C}^1\text{H}$ ), and mass calibration

was achieved using standard iron oxide references. The isotope ratio of the two  $^{12}\text{C}$  and  $^{13}\text{C}$  carbon isotopes allowed us to localize and quantify the  $^{13}\text{C}$ -labeled PHE. The quantitative data acquired by NanoSIMS were calculated with Winimage software that directly processes image data (CAMECA file format) and measures the  $\delta^0/00$  isotopic deviation according to the  $\delta^0/00$  formula (Eq. 1) for each pixel. The deviation of the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio was calculated based on a fixed  $R_{\text{ref}}$  value (commonly 1.107‰, the natural isotope ratio for  $^{13}\text{C}$ ). The isotopic ratio of  $^{13}\text{C}$  determined by NanoSIMS was not compared to IRMS values because of the presence of the epoxy resin which prevents a specific  $^{13}\text{C}$  signal of organic matter (Vidal et al., 2016). The scale of all the images of isotopic map deviation was kept constant (0 to 300) to allow for a quick comparison of intensity levels.

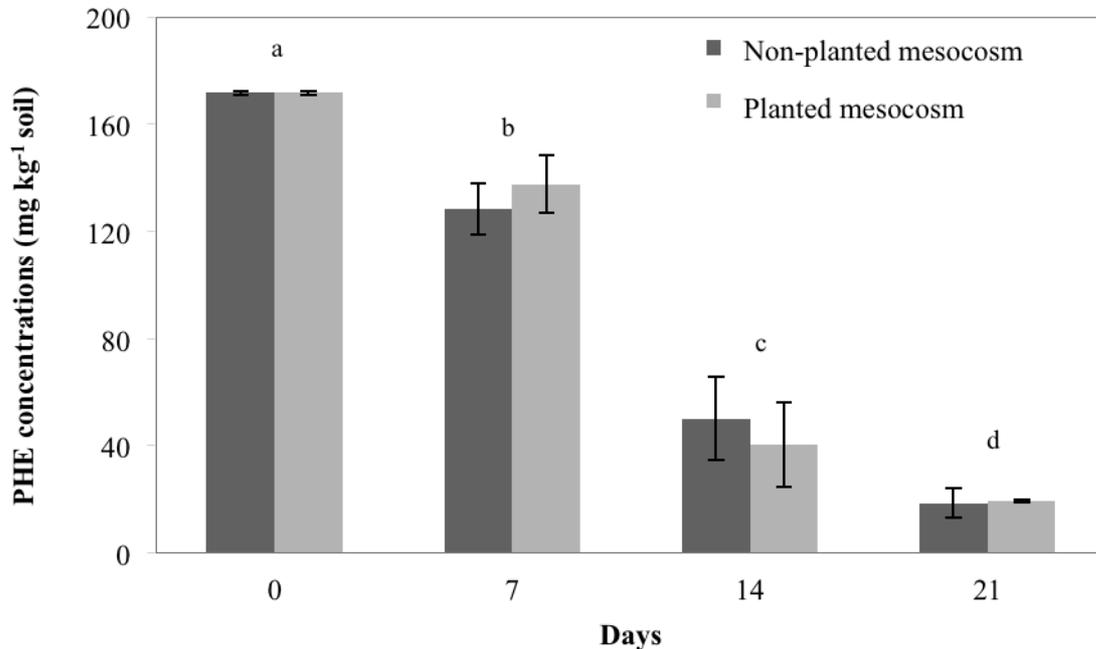
Carbon-to-nitrogen ( $^{12}\text{C}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ ) and sulfur-to-nitrogen ( $^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ ) ratio data were extracted from regions of interest (ROIs) by using the freeware package Image J. Each ROI was drawn at least twice for each group in order to obtain a mean ratio for any given area. Linescan (=segments of variable length drawn on the ion image) data were also extracted using OpenMIMS plugging with ImageJ software. Preparation and SIMS analyses were carried out with a Cameca NanoSIMS 50 at the Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST) in Esch-sur-Alzette, Luxembourg.

#### 2.4. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using R software (version 3.1.3, 2015). All tests were used with a 95% significant level. Parametric conditions were checked with Shapiro-Wilk's test for normality and with Bartlett's test for homogeneity of variance. When normality conditions were not met, a non-parametric statistical test was used for multiple comparisons of means. Two-way analysis of variance (ANOVA 2) followed by Tukey's post hoc test was used for the comparison of PHE and  $^{13}\text{C}$  concentrations between sampling times and between treatments. For NanoSIMS analysis, the relative abundance levels of  $^{13}\text{C}$  from ROI were compared with a non-parametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test).

### 3. Results

#### 3.1. Phenanthrene concentrations in planted and non-planted mesocosms



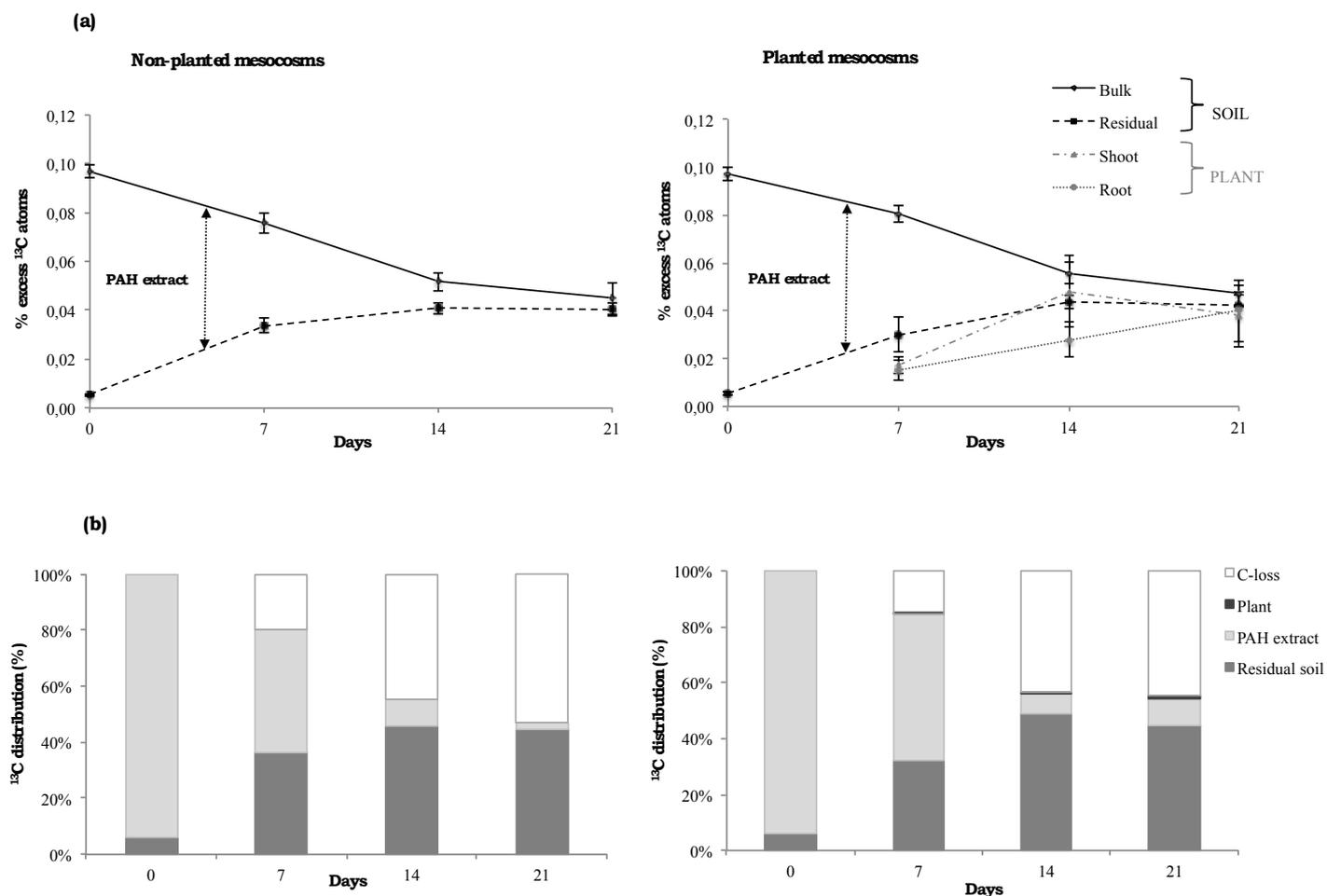
**Figure IV-1.** Extractable concentrations of phenanthrene (PHE) ( $\text{mg kg}^{-1}$  of soil) in planted and non-planted mesocosms at different time-points over a 21-day period. Means  $\pm$  SD,  $n = 4$ . Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the sampling times.

The extractable PHE concentration immediately after soil spiking ( $T_0$ ) was  $171.6 \pm 0.7 \text{ mg kg}^{-1}$  (**Figure IV-1**). After 7 days, PHE concentrations were  $128.1 \pm 9.7$  and  $137.6 \pm 10.8 \text{ mg kg}^{-1}$  in the planted and non-planted mesocosms, respectively, indicating 20-25% PHE dissipation. The main decrease in PHE concentration was noted after 14 days, with  $49.8 \pm 15.6$  and  $40.2 \pm 15.9 \text{ mg kg}^{-1}$  of PHE in the planted and non-planted mesocosms, respectively, i.e. approximately 70% of PHE loss. Finally, after 21 days there remained less than  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  of PHE in each mesocosm. The PHE concentration decreased significantly over time: 90% of the added PHE was dissipated after 21 days. No significant difference in PHE concentrations was noted over time between the planted and non-planted mesocosms.

### 3.2. $^{13}\text{C}$ -enrichment and distribution in the planted and non-planted mesocosms

$^{13}\text{C}$ -enrichment ( $E^{13}\text{C}$ ) values are summarized in **Table IV-1** and **Figure IV-2a**. No significant difference in  $E^{13}\text{C}$  was noted between the planted and non-planted mesocosms.  $E^{13}\text{C}$  of the bulk soil decreased from 0.097 at.% at T0 down to 0.047 at.% after 21 days, while  $E^{13}\text{C}$  of the residual soil increased from 0.005 at.% to 0.044 at.% over the same time period. At the end of the trial, there was no significant difference in  $^{13}\text{C}$  concentration between the bulk and residual soils, indicating that  $^{13}\text{C}$  was mainly present in the residual soil under a non-extractable form (**Table IV-1**).  $E^{13}\text{C}$  in plant tissues was studied after 7 days. It reached 0.015 at.% and 0.017 at.% in the roots and shoots, respectively. From 14 days, no significant difference was noted between root and shoot  $E^{13}\text{C}$  due to the high heterogeneity of values. After 21 days,  $E^{13}\text{C}$  in residual soil as well as in ryegrass shoots and roots was around 0.04 at.%.

$^{13}\text{C}$  distribution was measured over time for the different compartments of the mesocosms: residual soil, PAH extract, plant, and C loss (**Figure IV-2b**). At T0, 94% of the total  $^{13}\text{C}$  content was recovered in the PAH extract, and 6% in the residual soil. The  $^{13}\text{C}$  content of the PAH extract decreased over time down to 3-11% of the total  $^{13}\text{C}$  content, while it increased significantly in residual soil and reached 45-48% of the total  $^{13}\text{C}$  content after 21 days. The ryegrass  $^{13}\text{C}$  content represented less than 1% of the total  $^{13}\text{C}$  content, mainly due to the very low dry mass as compared to the total mass of soil (a few mg versus 40 g). The  $^{13}\text{C}$  loss from mesocosms accounted for 19% after 7 days and up to 43% after 14 days.



**Figure IV-2.**  $^{13}\text{C}$  dynamics after  $^{13}\text{C}$ -PHE spiking in non-planted (left) and planted (right) mesocosms at different time-points over a 21-day period. (a)  $^{13}\text{C}$  enrichment ( $E^{13}\text{C}$  %) in the plant and soil compartments. Means  $\pm$  SD,  $n = 4$ .  $^{13}\text{C}$  enrichment was calculated from  $\delta^{13}\text{C}$  data obtained by EA-IRMS. (b)  $^{13}\text{C}$  distribution in the mesocosm compartments (PAH extract, residual soil, plant, and C loss). Results are expressed as percentages of the  $^{13}\text{C}$ -PHE concentrations initially added in the soil. The plant compartment gathers root and shoot data. PAH extract concentrations were calculated as the difference between bulk and residual soil concentrations.

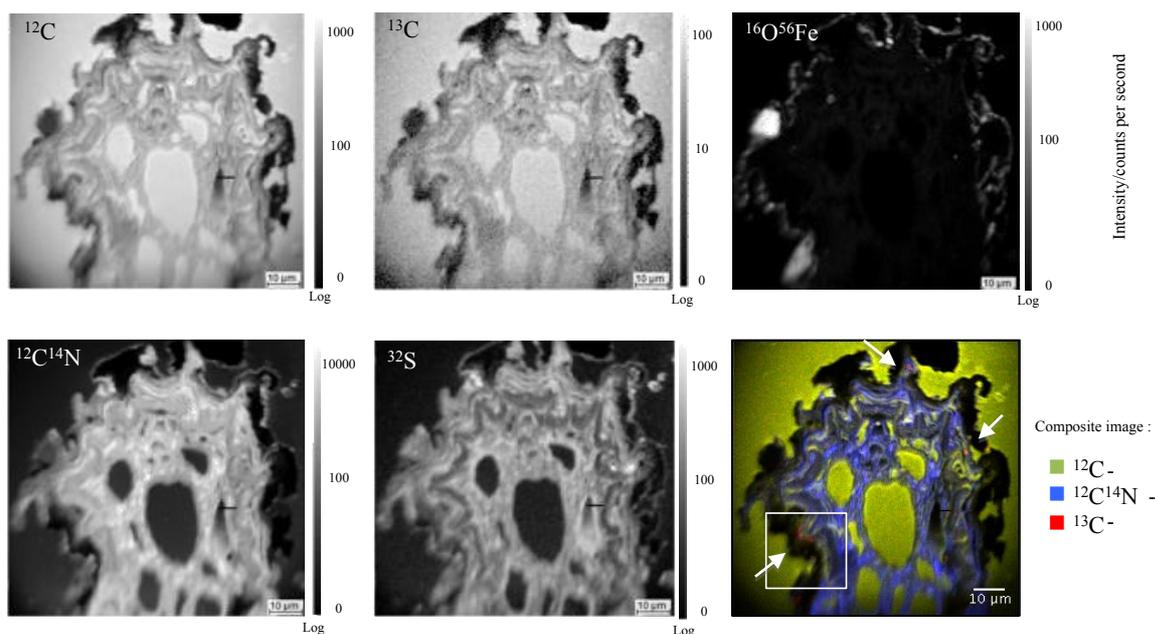
**Table IV-1.**  $\delta^{13}\text{C}$  values (‰), total C contents ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  soil) and <sup>13</sup>C concentrations obtained for soil and plant ( $\mu\text{g C g}^{-1}$  soil and  $\mu\text{g C g}^{-1}$  DM respectively) in non-planted (NP) and planted (P) mesocosms with <sup>12</sup>C (control) and <sup>13</sup>C (enriched) spiked soil. The  $\delta^{13}\text{C}$  values and C contents were measured by EA-IRMS and the <sup>13</sup>C concentrations were calculated from the measured data.

Time (Day)	Sample		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				Total carbon concentration ( $\text{mg C g}^{-1}$ of soil / $\text{mg C g}^{-1}$ of plant)				<sup>13</sup> C concentration ( $\mu\text{g C g}^{-1}$ of soil / $\mu\text{g C g}^{-1}$ of plant)			
			Soil		Plant		Soil		Plant		Soil		Plant	
	Mesocosm		Bulk	Residual	Shoot	Root	Bulk	Residual	Shoot	Root	Bulk	Residual	Shoot	Root
0	Control	-	-25.7 ± 0.1	-25.9 ± 0.1			27.5 ± 1.1	24.9 ± 1.1						
	Enriched	-	62.5 ± 2.4	-21.1 ± 0.5			23.5 ± 0.7	25.4 ± 2.6			22.9 ± 1.3 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>A</sup>		
7	Control	NP	-25.4 ± 0.3	-25.9 ± 0.1			25.9 ± 1.4	24.4 ± 0.6						
		P	-25.4 ± 0.3	-25.8 ± 0.2	-25.8 ± 1.6	-27.6 ± 0.7	25.8 ± 1.9	24.9 ± 1.9	396.0 ± 1.7	359.6 ± 33.8				
	Enriched	NP	43.5 ± 4.0	4.9 ± 2.6			24.3 ± 1.1	24.6 ± 1.9			18.4 ± 1.4 <sup>b</sup>	8.3 ± 0.9 <sup>B</sup>		
		P	47.8 ± 3.3	1.5 ± 6.6	-10.3 ± 1.6	-14 ± 3.2	24.0 ± 0.0	24.4 ± 0.7	395.0 ± 3.9	364.2 ± 6.7	19.3 ± 0.9 <sup>b</sup>	7.3 ± 1.7	71.4 ± 9.9	56.6 ± 13.3
14	Control	NP	-25.7 ± 0.1	-25.9 ± 0.1			25.2 ± 1.4	24.9 ± 1.8						
		P	-25.8 ± 0.2	-25.9 ± 0.2	-26.9 ± 0.6	-26.6 ± 0.9	25.2 ± 0.9	24.6 ± 1.0	368.1 ± 26.6	223.7 ± 106.0				
	Enriched	NP	21.2 ± 3.3	11.2 ± 2			24.9 ± 2.3	25.5 ± 1.7			12.9 ± 1.7 <sup>c</sup>	10.4 ± 0.2 <sup>c</sup>		
		P	25.0 ± 4.0	13.7 ± 2.5	16.8 ± 13.3	-1.3 ± 6.4	23.1 ± 0.5	25.3 ± 1.7	389.5 ± 4.5	333.8 ± 27.6	12.9 ± 1.0	11.0 ± 0.8	191.2 ± 60.4 <sup>A</sup>	92.5 ± 23.2 <sup>A</sup>
21	Control	NP	-25.8 ± 0.2	-25.9 ± 0.2			24.6 ± 0.4	25.2 ± 0.8						
		P	-25.6 ± 0.4	-25.8 ± 0.1	-27.2 ± 0.3	-26.5 ± 0.1	24.4 ± 0.4	25.3 ± 2.2	358.9 ± 5.1	308.8 ± 50.2				
	Enriched	NP	14.9 ± 5.8	11.0 ± 2.7			24.6 ± 2.3	25.2 ± 2.6			10.9 ± 1.0 <sup>c</sup>	10.2 ± 0.7 <sup>c</sup>		
		P	17.5 ± 0.7	12.5 ± 0.4	7.2 ± 12.1	9.9 ± 11.9	26.7 ± 2.7	24.2 ± 1.2	396.7 ± 2.7	322.1 ± 16.9	12.6 ± 1.3	10.2 ± 0.5	150.8 ± 56.2 <sup>A</sup>	130.4 ± 41.8 <sup>A</sup>

\* Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) in bulk (a,b,c) and residual soil (A,B,C) between sampling times. No significant difference ( $p > 0.05$ ) was found between planted and non-planted soil mesocosms and between roots and shoots.

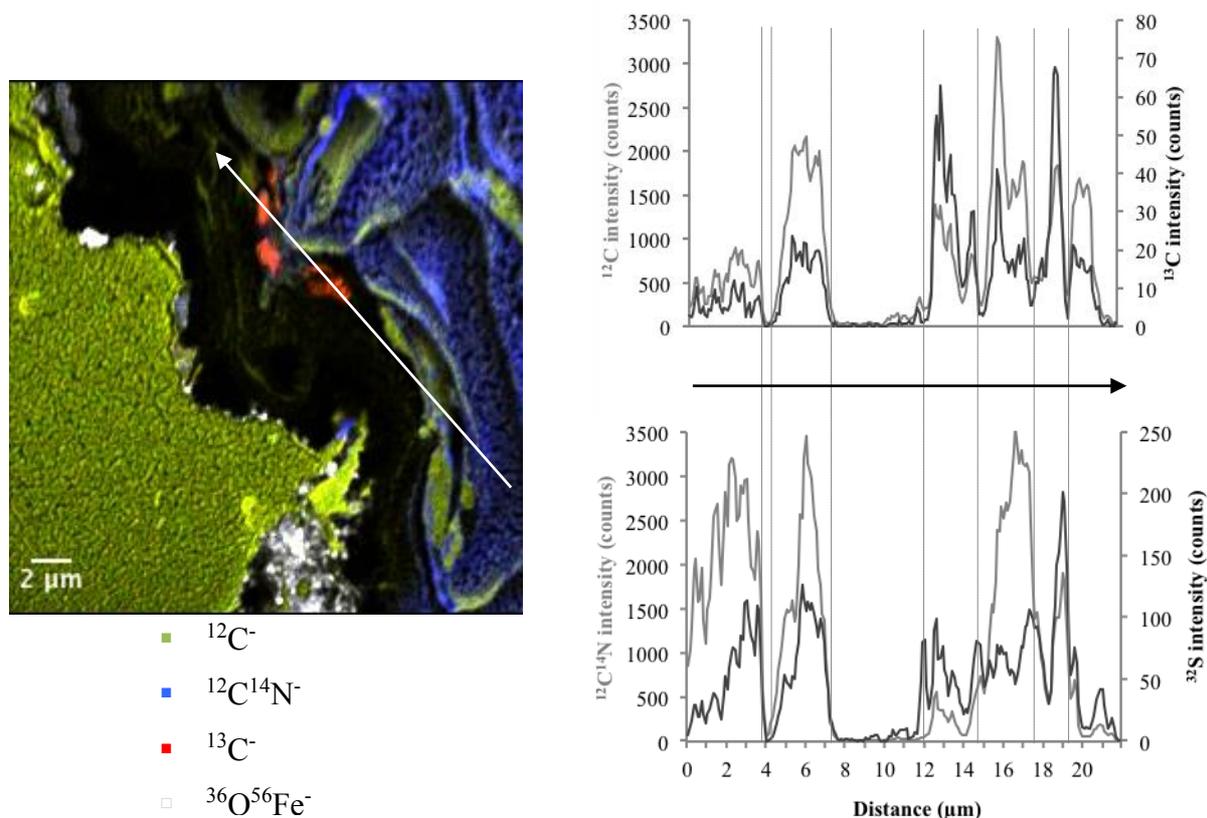
### 3.3. Mapping of $^{13}\text{C}$ enrichment in ryegrass roots

NanoSIMS analyses were carried out on unlabeled and labeled roots after 7 and 14 days. The mean percentages of  $^{13}\text{C}$  atoms in the roots were 1.09 in unlabeled (control) roots, 1.11 in  $^{13}\text{C}$ -labeled roots after 7 days, and 1.15 in  $^{13}\text{C}$ -labeled roots after 14 days. A significant  $^{13}\text{C}$ -enrichment was noted in labeled roots after 14 days relatively to the control.



**Figure IV-3.** NanoSIMS elemental maps of  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ ,  $^{32}\text{S}$  and  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}$  from labeled ryegrass roots after 14 days. The  $90 \times 90\text{-}\mu\text{m}^2$  images are cross views of whole roots with adherent soil particles. A composite image (bottom right) was obtained by overlaying the  $^{12}\text{C}$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  images. Three areas of interest (bordered in white) with higher  $^{13}\text{C}$  content were identified. NanoSIMS data were analyzed using Winimage software.

A mapping of  $^{13}\text{C}$  associated with  $^{12}\text{C}$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ ,  $^{32}\text{S}$ ,  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}$  ion species was performed on root cross sections after 14 days (**Figure IV-3**). The roots were clearly identified in association with high  $^{12}\text{C}$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  and  $^{32}\text{S}$  signals. The resin was clearly visible with high  $^{12}\text{C}$  levels but no  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  or  $^{32}\text{S}$  intensity, and was easily differentiated from the root tissue. Mineral particles such as iron oxides, assimilated to soil particles, were highlighted by the  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}$  signal and they were only observed surrounding the root. The composite image resulting from the overlay of  $^{12}\text{C}$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  elements emphasized  $^{13}\text{C}$  enrichment localization. There was no visual evidence of global  $^{13}\text{C}$  enrichment in the roots, but rather locally distributed hotspots. Three zones were identified close to the root epidermis (**Figure IV-4**), but none close to the soil particles. These hotspots were mainly oval-shaped, and 1 to 2  $\mu\text{m}$  in diameter.



**Figure IV-4.** NanoSIMS composite image and linescan obtained from root tissue after 14 days. The zone is located inside the white square of Figure 3. (a) Composite  $25 \times 25\text{-}\mu\text{m}^2$  image with hotspots reflecting the  $^{13}\text{C}$ -enrichment (red) obtained by overlaying  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  and  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^-$  (white) ion species images. (b) A white segment was drawn through these hotspots (H) and the root (R) tissue to obtain the linescan profiles. They provided information on the elemental distribution of nitrogen, sulfur, and labeled and unlabeled carbon, and concerned  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  relatively to  $^{32}\text{S}$  and  $^{13}\text{C}$  relatively to  $^{12}\text{C}$  (top to bottom).

An area of interest, pinpointed by the white square in **Figure IV-3**, was enlarged and presented in **Figure IV-4a**) Hotspots (red), root (green and blue association), soil (white) and resin (green) were well identified. The black zone between the resin and the root could be holes that formed during sample preparation. The hotspots were adherent to the root epidermal cells but not to the soil particles. A linescan was drawn through root and hotspots (**Figure IV-4b**) to study  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  and  $^{32}\text{S}^-$  distribution. It showed that a higher  $^{13}\text{C}^-$  signal as compared to  $^{12}\text{C}^-$  was correlated with a higher  $^{32}\text{S}^-$  signal as compared to  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ . This higher  $^{32}\text{S}^-$  signal as compared to  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  was not observed in the root but only in the hotspot, so that the hotspots appeared to be made of something else than root tissue.  $^{12}\text{C}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ ,  $^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  and  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}/^{12}\text{C}$  ratios were also calculated for ROI selection in the hotspots, root tissue, soil particles and resin (**Table IV-2**). Hotspots were easily discriminated from roots because they displayed significantly higher  $^{12}\text{C}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  and  $^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  ratios. They

were not considered as soil particles because they had a low <sup>56</sup>Fe<sup>16</sup>O/<sup>12</sup>C ratio, or as resin because they contained less C than resin (<sup>12</sup>C/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N ratios equivalent to 12.88 for resin and 1.02 for hotspots).

**Table IV-2.** <sup>12</sup>C/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N, <sup>32</sup>S/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N and <sup>56</sup>Fe<sup>16</sup>O/<sup>12</sup>C ratios in the hotspots, root tissues, soil, and resin identified in Figure 4. Mean ratios (±SD) were extracted from Regions Of Interest (ROIs) using OpenMIMS plugin in the freeware package Image J. \* (p<0.10), \*\* (p<0.05), \*\*\* (p<0.001), indicate significant differences between ROI classes according to Wilcoxon rank-sum test.

ROI class	<sup>12</sup> C/ <sup>12</sup> C <sup>14</sup> N	<sup>32</sup> S/ <sup>12</sup> C <sup>14</sup> N	<sup>56</sup> Fe <sup>16</sup> O/ <sup>12</sup> C
<b>Hotspot</b>	1.02 ± 0.25	0.11 ± 0.03	0.001 ± 0.00
<b>Root</b>	** 0.33 ± 0.08	0.02 ± 0.00	* 0.002 ± 0.00
<b>Soil</b>	*** 1.49 ± 0.14	0.23 ± 0.05	*** 2.18 ± 1.70
<b>Resin</b>	12.88 ± 1.79	0.04 ± 0.00	0.000 ± 0.00

## 4. Discussion

### 4.1. Effect of the rhizosphere on phenanthrene degradation

The extractable PHE concentration decreased by 40% after spiking and by up to 90% after 21 days in the planted and non-planted systems (**Figure IV-1**). This rapid dissipation of PHE and its high rate are in part explained by experimental conditions, including the high bioavailability of the freshly spiked pollutant and soil inoculation with adapted microflora. Smith et al. (2011) showed that using a soil freshly spiked with pure PAH led to a greater loss than using historically contaminated soils. Inoculation of a microflora extracted from PAH-contaminated soil had a priming effect in the first days following contamination and increased PHE degradation (Joner et al., 2004; Joner et al., 2002). Low-molecular-weight PAHs such as PHE (3 rings) can be used as primary substrates and be easily broken down in the soil by adapted microflora commonly found in polluted soils (Cerniglia, 1997). This rapid PHE degradation could mask a potential rhizospheric effect, even in a forest soil. No significant difference was noted in <sup>13</sup>C-dynamics between the planted and non-planted systems (**Figure IV-2**). Therefore, there is no evidence of an impact of the rhizosphere on PAH degradation in this type of plant-soil mesocosm.

#### 4.2. Dynamics of phenanthrene carbon in the plant-soil mesocosms

The dynamics of PHE degradation was studied by monitoring the increase in C loss and C incorporation in the soil (**Figure IV-2a**). The loss of  $^{13}\text{C}$  during the first 14 days represented half of the spiked  $^{13}\text{C}$  (**Figure IV-2b**). We hypothesized that a major part of the PHE loss was mineralized as  $\text{CO}_2$ . There was no significant difference in PHE degradation between 14 and 21 days, which means that PHE degradation occurred during the first days of contamination.

After 14 days, almost 40% of PHE carbon had been incorporated in the soil. This result is in accordance with the 38% of  $^{13}\text{C}$  remaining in the soil after 12 days in comparable soil mesocosms used to identify PAH-degrading bacteria (Cébron et al., 2011). No PHE metabolite, like those identified by Käckner et al. (2002) and Richnow et al. (2000) for example, was detected by GC-MS analysis of PAH extracts. The remaining  $^{13}\text{C}$  incorporated in the soil must then have been present under the form of other organic compounds that were not extracted by dichloromethane. Kästner et al. (1999) conducted a long-term experiment on the transformation of  $^{13}\text{C}$ -labeled PAHs in soil bioreactors; they highlighted that the non-extractable residue had a relatively high stability over time. These organic compounds, newly formed from PAHs, become soil-bound residues (Binet et al., 2000) and/or a C source for microorganisms (Richnow et al., 1998; 2000). For Richnow et al. (1999), the formation of these compounds most probably depends on an intense microbial activity. Soil microorganisms may use organic pollutants like PAHs as a C source and transform them into biomass through anabolic processes. Part of these newly formed compounds can also be incorporated into organo-mineral complexes and be protected against degradation depending on the nature of mineral phases (de Junet et al., 2013). This could explain why these organic compounds remain non-available in the soil (Macleod and Semple, 2003; Pignatello and Xing, 1996) and have a relative high stability (Richnow et al., 1999).

Less than 1% of total PHE carbon was taken up by ryegrass roots and shoots. No significant difference was noted between the two plant parts after 14 and 21 days. Plant  $^{13}\text{C}$  enrichment was similar to soil  $^{13}\text{C}$  enrichment, namely about 0.04 at.% (**Figure IV-2a**), and the difference expressed in total amounts was only due to the difference in mass between the soil and the plants. However, according to NanoSIMS analyses (**Figure IV-4**), there was no evidence of direct PHE uptake by plant roots. A small part of PHE may have been sorbed onto the root epidermis, more precisely near the suberized exodermis and endodermis (Dupuy et al., 2016). Previous studies show preferential PAH incorporation in shoots through

atmospheric deposition, and low direct incorporation by roots (Binet et al., 2000b; Desalme et al., 2011; Schwab and Banks, 1994). If  $^{13}\text{C}$  was not taken up by the roots under the form of PHE, it may have been taken up under the form of newly formed organic compounds or  $^{13}\text{C}$ - $\text{CO}_2$ . It could be absorbed or adsorbed from ambient air by the shoots after PHE volatilization (Gao and Zhu, 2004) or through stomata under the form of  $^{13}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  during the photosynthetic process.  $^{13}\text{C}$  enrichment was also noted in roots by SIMS, confirming the excess  $^{13}\text{C}$  recovered in the roots (**Figure IV-2a**).

#### 4.3. Determination of $^{13}\text{C}$ hotspots and localization of $^{13}\text{C}$ in ryegrass roots

There was no correlation between the  $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}$  and  $^{13}\text{C}$  signals close to the roots after 14 days, therefore SIMS analyses did not evidence any contribution of organic matter-mineral associations to the  $^{13}\text{C}$ -PAH dynamics. However, two types of enrichment were highlighted in the plant rhizosphere: a global  $^{13}\text{C}$  enrichment and  $^{13}\text{C}$  hotspots. Hotspots were composed of  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  and  $^{32}\text{S}^-$  ions species. Sulfur and nitrogen contents suggest the presence of proteins (Eybe et al., 2008) that could originate from the plants or from microorganisms. Hotspots were discriminated from root tissues based on their high  $^{32}\text{S}$  content as compared to the roots (**Figure IV-4** and **Table IV-2**). The  $^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  ratio of the hotspots (0.11) was around five times higher than the  $^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  ratio of the ryegrass roots (0.02). This last value is in accordance with the  $^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  ratio of 0.027 found by Dijkshoorn and Van Wijk (1967) in ryegrass shoots. The oval shape of the hotspots and their size (1 to 2  $\mu\text{m}$  in diameter) are in accordance with the shape and size of bacteria. Moreover, measurements were performed on isolated bacteria (unpublished data) and showed similar ratios (0.1 for  $^{32}\text{S}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ ). There was evidence of global  $^{13}\text{C}$  enrichment during plant growth, but no PAH uptake by the roots was visualized by NanoSIMS analyses (**Figure IV-4**). The main  $^{13}\text{C}$ -PAH uptake could be attributed to the bacteria present in the rhizospheric environment.

## 5. Conclusion

A mesocosm experiment was conducted using  $^{13}\text{C}$ -phenanthrene to monitor the dynamics of PHE and derived compounds in the soil and in ryegrass. After 21 days, almost 90% of spiked PHE had been degraded. PHE was mainly mineralized under gas phase (up to 53%, corresponding to the  $^{13}\text{C}$  loss). But after 14 days, more than 40% of PHE carbon had

been transformed into newly formed organic compounds (metabolites) or incorporated into the microbial biomass. No rhizospheric effect on PAH dynamics was noted due to the rapid dissipation of PHE. Less than 1% of PHE carbon was also found in the root and shoot tissues of ryegrass. The plant  $\text{E}^{13}\text{C}$  was similar to the soil  $\text{E}^{13}\text{C}$  ( $\sim 0.04$  at.%), suggesting a homogeneous C-PAH distribution in the plant-soil mesocosm.

Global root C-PAH enrichment was also determined in the ryegrass rhizosphere at a finer scale using NanoSIMS, based on  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio measurements on images obtained for control ( $^{12}\text{C}$ ) and labeled samples after 7 and 14 days. There was no evidence of  $^{13}\text{C}$ -PAH association to iron oxides in the close root environment. However, hotspots of  $^{13}\text{C}$  enrichment close to the roots probably indicated the presence of bacteria, as suggested by their size, shape and element composition. A part of PAH carbon was sorbed on the roots, but it was mainly incorporated into the bacteria mentioned above. These bacteria probably degraded PHE and incorporated PHE-derived  $^{13}\text{C}$  into their biomass.

The use of labeled contaminants and the coupling of IRMS and NanoSIMS is a relevant and powerful tool for determining the dynamics of these contaminants. The dynamics of  $^{13}\text{C}$  from labeled PAH was highlighted by  $^{13}\text{C}$ -partitioning at a global level, but the transformation of PAH  $^{13}\text{C}$  at a molecular level remains to be investigated. Complementary techniques such as  $^{13}\text{C}$ -NMR and pyGCMS could be used to further characterize the  $^{13}\text{C}$ -PAH metabolites.

**Acknowledgements.** This work was supported by a grant from the University of Lorraine and the Lorraine Region. The authors thank David Billet for UHPLC analyses and Patrick Grysan for NanoSIMS analyses.



**Chapitre V. Identification et  
localisation des composés  
organiques issus du  $^{13}\text{C}$ -PHE dans  
le sol rhizosphérique.**



## 1. Introduction

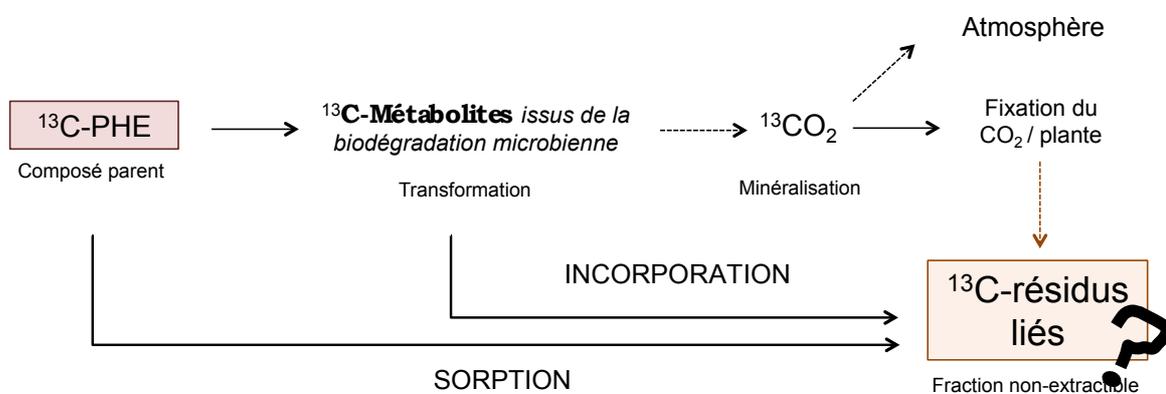
La compréhension des mécanismes gouvernant la mobilité et la dégradation des HAP dans les sols est une étape clé pour prédire leur devenir (Doick et al., 2005). L'application d'un HAP marqué, en utilisant un isotope stable ou radioactif, a été couramment utilisée ces dernières décennies pour suivre la transformation des polluants dans le sol et la formation de résidus liés (Käcker et al., 2002; Richnow et al., 1998). D'après les travaux de Richnow et al. (2000) les produits marqués issus de la dégradation du PHE retrouvés sous forme de résidus liés sont des métabolites connus du PHE. Cependant, les données concernant la structure moléculaire des résidus liés produits à partir des HAP sont limitées.

Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser le  $^{13}\text{C}$ -PHE comme HAP modèle afin de pouvoir identifier les métabolites marqués au  $^{13}\text{C}$  dans le sol rhizosphérique. Dans le chapitre IV, nous avons montré qu'une fraction importante du  $^{13}\text{C}$  était retrouvée dans la partie non-extractible au DCM. En effet, environ 45% du  $^{13}\text{C}$  est sous forme de résidus liés, mais sous quelle forme et où se retrouvent ces composés néoformés marqués dans le sol ? C'est l'objet de ce chapitre. Les composés qui peuvent constituer le résidu non-extractible sont (i) les composés parents (ii) les métabolites chimiques et/ou (iii) le  $^{13}\text{C}$  incorporé dans la biomasse microbienne (**Figure V-1**). Les composés nouvellement formés peuvent être très variés et donc se comporter différemment dans le sol. Les produits de dégradation vont avoir tendance à être plus réactifs que les composés parents et de ce fait favoriser la formation de la fraction non-extractible au solvant (Kästner et al., 1999).

En raison de la complexité de la matrice et de la présence d'éléments pouvant considérablement interférer lors des analyses, l'identification des composés issus du  $^{13}\text{C}$ -PHE n'a pas pu être réalisée directement sur le sol brut. C'est pourquoi, nous avons choisi d'utiliser deux méthodes de prétraitement du sol de manière à pouvoir caractériser la matière organique issue du  $^{13}\text{C}$ -PHE. Les deux procédures employées sont illustrées dans la **Figure V-2**, et ont été utilisées sur les échantillons de sol plantés (témoin et enrichi). Ainsi, dans l'intention de localiser et d'identifier les composés marqués issus des processus de dégradation et de transformation du  $^{13}\text{C}$ -PHE dans le sol, les trois méthodes de prétraitement qui ont été sélectionnées et appliquées sont :

- Une **méthode d'extraction (ASE) à l'eau** du résidu de sol après extraction des HAP (au DCM) (**Figure II-7**) dans le but d'identifier une partie des composés  $^{13}\text{C}$  restant liés au sol après extraction au solvant.

- Une **méthode de fractionnement par densimétrie** (Figure II-7) pour séparer la MO libre de la MO associée aux phases minérales dominantes. Cette technique va permettre, premièrement d'isoler les oxyhydroxydes de fer, et a posteriori de localiser le  $^{13}\text{C}$  dans les MO liées ou non. Deux coupures ont été choisies pour cela, une première à  $1.9 \text{ g.cm}^{-3}$  afin de séparer la fraction légère contenant la MO libre des MO complexées. Et une seconde, la plus dense, à  $2.7 \text{ g.cm}^{-3}$  pour isoler les MO associées aux oxyhydroxydes de fer des autres. Ils sont suivis de caractérisations par  $^{13}\text{C}$ -RMN solide et liquide et par TD/pyGCMS, techniques permettant de fournir des informations sur la nature chimique des composés marqués.
- Une **extraction de l'ADN microbien** (Chapitre II- §3-5-2) à partir du sol rhizosphérique brut témoin et enrichi a également été réalisée. Les extraits ont ensuite été analysés en IRMS pour compléter une partie des résultats mis en évidence dans les **Chapitres III et IV**, qui suggère qu'une partie du  $^{13}\text{C}$  issu du  $^{13}\text{C}$ -PHE aurait été incorporée dans la biomasse bactérienne.



**Figure V-1.** Produits de dégradation du  $^{13}\text{C}$ -PHE et contribution potentielle de ces produits dans la formation des résidus liés non extractible du sol d'après (Kästner et al., 1999).

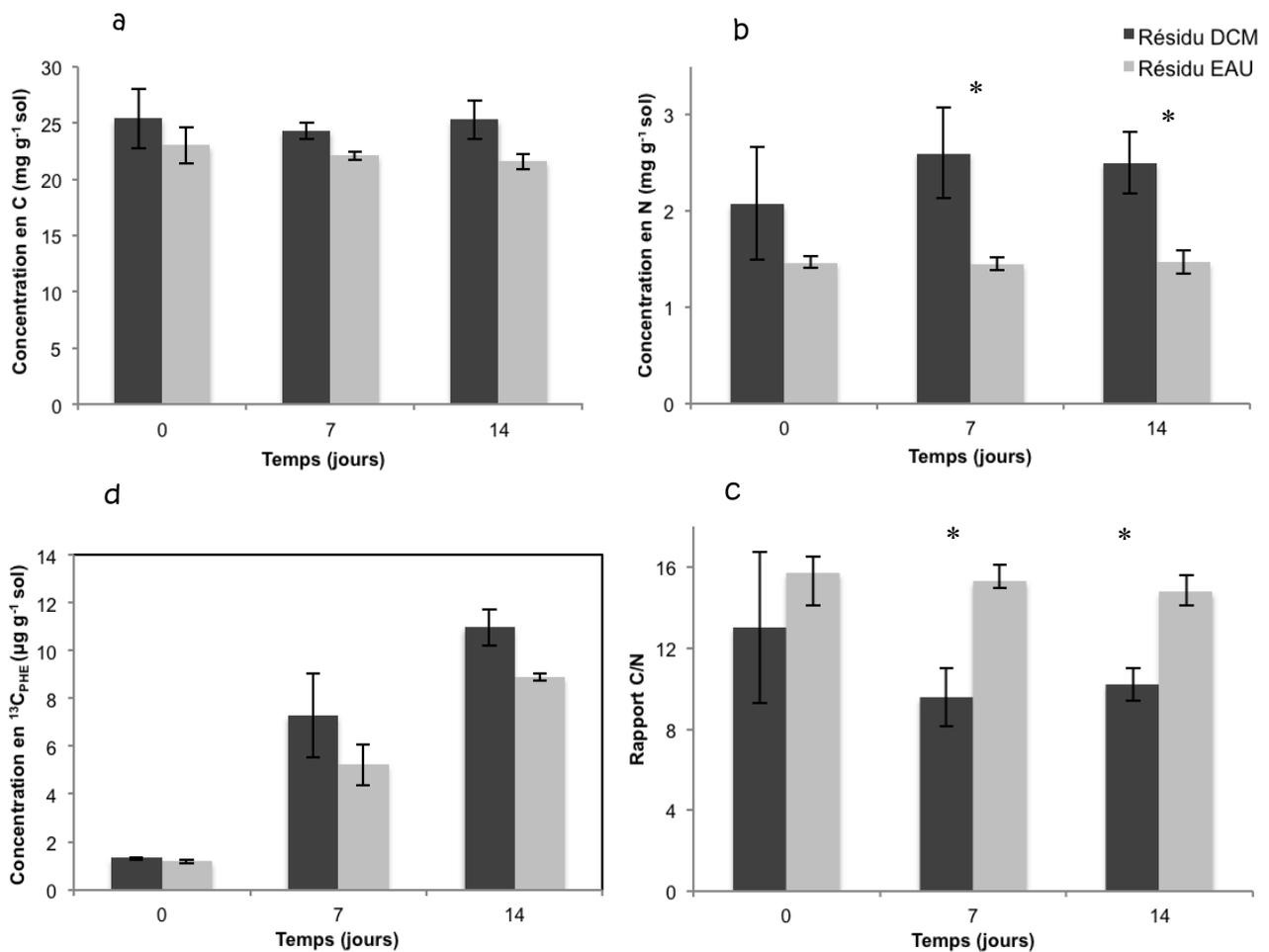
## 2. Résultats

### 2.1. Analyse des composés hydrosolubles issus du $^{13}\text{C}$ -PHE

L'extraction à l'eau ultrapure par ASE (**Figure II-7**) a été réalisée à partir des résidus DCM de façon à identifier certains des composés marqués formant la fraction non-extractible du sol. Les résultats d'enrichissement isotopique sont donnés pour les résidus de sol après extraction au DCM et à l'eau, et les spectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN liquide d'un extrait aqueux enrichi et d'un extrait témoin (T14) sont présentés ensuite (§2.1.2).

#### 2.1.1. Enrichissement isotopique du résidu de sol « EAU »

Les teneurs en carbone, en azote, les rapports C/N et les concentrations en  $^{13}\text{C}$  mesurées dans le résidu « DCM » et le résidu « EAU » sont présentés dans la **Figure V-2**.



**Figure V-2.** Concentrations en carbone (a), azote (b), rapport C/N (c) et concentrations en  $^{13}\text{C}$ -PHE (d) des résidus de sol "DCM" et "EAU". Différences significatives entre les deux traitements « DCM » et « EAU » : (\*)  $p < 0,05$  (\*\*)  $p < 0,01$ .

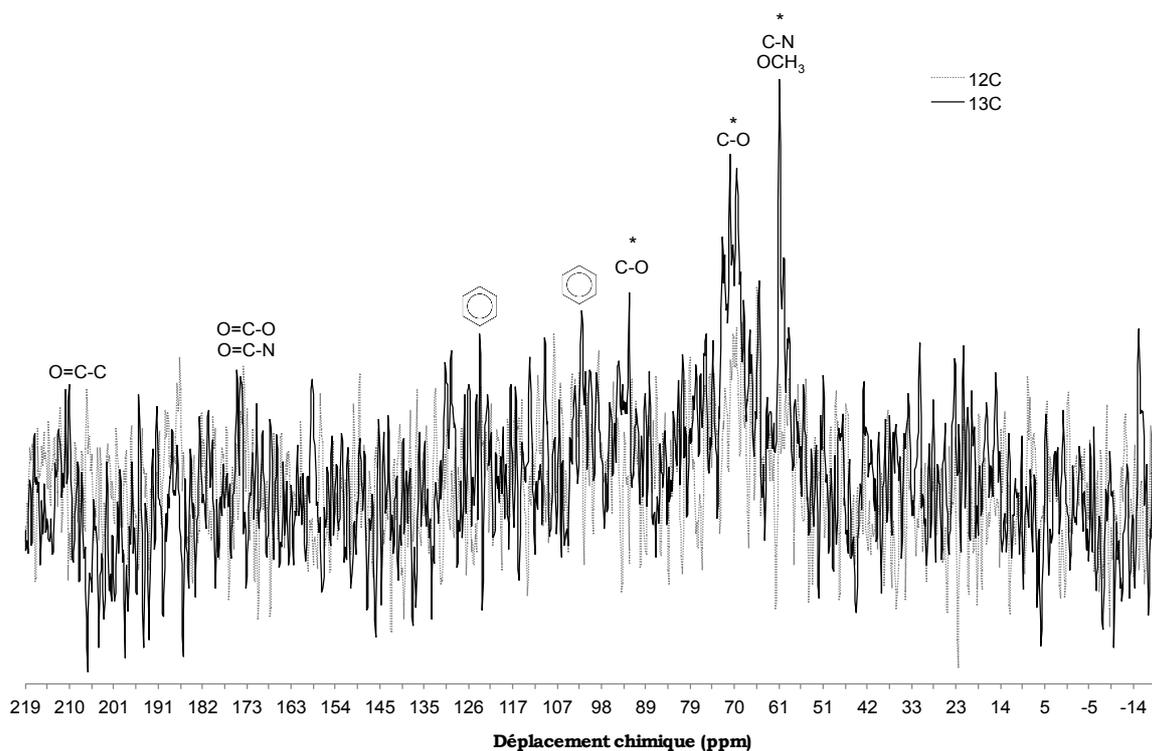
Les concentrations en carbone à 0, à 7 et à 14 jours pour les résidus DCM et EAU sont comprises entre 22 et 25  $\text{mg.g}^{-1}$  en moyenne et ne présentent pas de différences significatives ni au cours du temps, ni entre les deux résidus. Les concentrations en azote sont significativement plus faibles dans le résidu EAU que dans le résidu DCM au temps T7 et T14 et passent de 2,5  $\text{mg.g}^{-1}$  dans le résidu DCM à 1,5  $\text{mg.g}^{-1}$  environ dans le résidu EAU. En revanche à T0, les teneurs en azote ne sont pas significativement différentes entre les résidus DCM et EAU. Comme l'indiquent les écarts-types, une forte hétérogénéité entre les répliquats pour le résidu DCM est observée.

Aux temps T7 et T14, le rapport C/N est significativement plus élevé dans les résidus EAU que dans les résidus DCM et passe de 10 à 15 en moyenne. A T0, étant donné l'écart-type important observé pour le résidu DCM aucune différence significative n'est visible entre les deux résidus.

Les concentrations en  $^{13}\text{C}$  calculées à partir des rapports isotopiques passent de 7  $\mu\text{g.g}^{-1}$  à 7 jours à 11  $\mu\text{g.g}^{-1}$  à 14 jours dans le résidu DCM et de 6 à 9  $\mu\text{g.g}^{-1}$  dans le résidu EAU. Malgré tout, aucune différence significative n'est observée entre les deux résidus pour les 3 temps.

### 2.1.2. Analyse par $^{13}\text{C}$ -RMN liquide à partir des extraits aqueux du sol

Les extraits aqueux issus de l'extraction à l'eau ultrapure des résidus de sol « DCM » à 14 jours (témoin et enrichi) ont été analysés en  $^{13}\text{C}$ -RMN liquide. Les spectres obtenus sont présentés dans la **Figure V-3**.



**Figure V-3.** Comparaison des spectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN à l'état liquide pour les extraits aqueux obtenus lors de l'extraction à l'eau chaude des résidus de sol (DCM) non marqué ( $^{12}\text{C}$ , trait pointillé) et marqué ( $^{13}\text{C}$ , trait plein) à 14 jours.

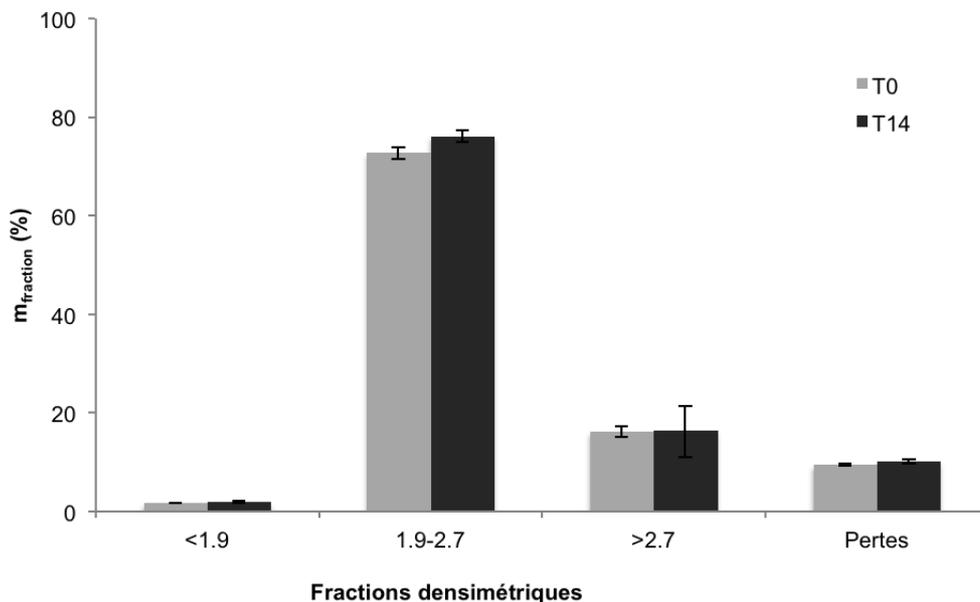
Des différences marquées (\*) entre les intensités obtenues pour le spectre témoin et le spectre enrichi sont observées au niveau de plusieurs régions : (i) **50-60 ppm**, déplacement chimique associé à des groupements méthoxy ( $\text{O}^*\text{CH}_3$ ) ou N-alkyle ( $^*\text{C-N}$ ) et (ii) à hauteur des déplacements chimiques **60-75 ppm** associés à des groupements O-alkyle ( $^*\text{C-O}$ ). Des différences, même faibles, sont aussi visibles aux alentours de **90 ppm** signal lié à la présence de carbone O-alkyle, mais aussi à 100 ppm, 120 ppm, 130 ppm déplacements chimiques associés à des noyaux aromatiques et à 210 ppm environ correspondant au groupe carbonyle ( $^*\text{C=O}$ ).

## 2.2. Analyse des composés issus du $^{13}\text{C}$ -PHE dans les fractions densimétriques des sols témoins et enrichis.

Les différentes fractions obtenues à la suite du fractionnement ont été caractérisées par des analyses élémentaires, minéralogiques, spectrométriques et spectroscopiques.

## 2.2.1. Identification des associations organo-minérales

### 2.2.1.1. Bilan de masse des fractions densimétriques



**Figure V-4.** Répartition massique des fractions densimétriques à T0 et à T14.

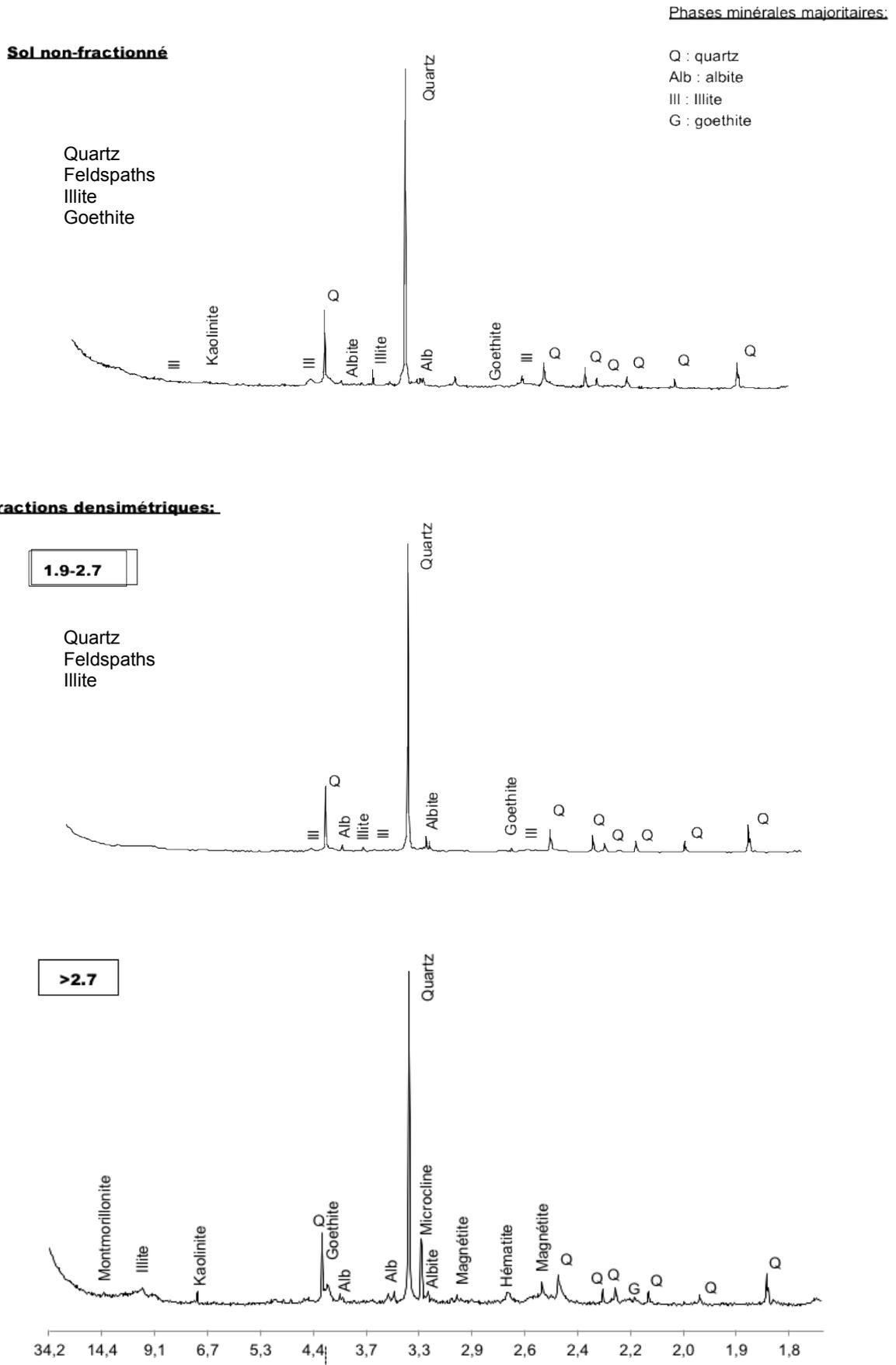
La **Figure V-4** présente la distribution de masse des fractions obtenues après séparation densimétrique à 0 et à 14 jours.

La fraction qui domine en termes de masse est la fraction 1.9-2.7 avec plus de 70%, suivie par la fraction >2.7 qui représente environ 20% de la masse totale de sol tandis que la fraction légère <1.9 ne représente qu'une faible proportion avec moins de 5%. Pour chacune des fractions, aucune différence significative n'est observée entre les deux temps.

Les pertes de matières induites lors des séparations densimétriques sont supérieures à 10% à T0 et à T14. Elles peuvent probablement être expliquées par la perte de minéraux lors des différentes étapes de fractionnement.

### 2.2.1.2. Identification des phases minérales par DRX

L'analyse minéralogique du sol non fractionné et des fractions denses 1.9-2.9 et >2.7 est présentée dans la **Figure V-5**. Les principales phases minérales identifiées dans ces dernières sont consignées dans le **Tableau V-1**.



**Figure V-5.** Diffractogrammes de rayons X obtenus pour le sol non fractionné et les fractions denses 1.9-2.7 et 2.7  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ .

**Tableau V-1.** Principaux minéraux associés aux fractions densimétriques <1.9, 1.9-2.7, >2.7 g.cm<sup>-3</sup> (✓ = identifié, - = non identifié)

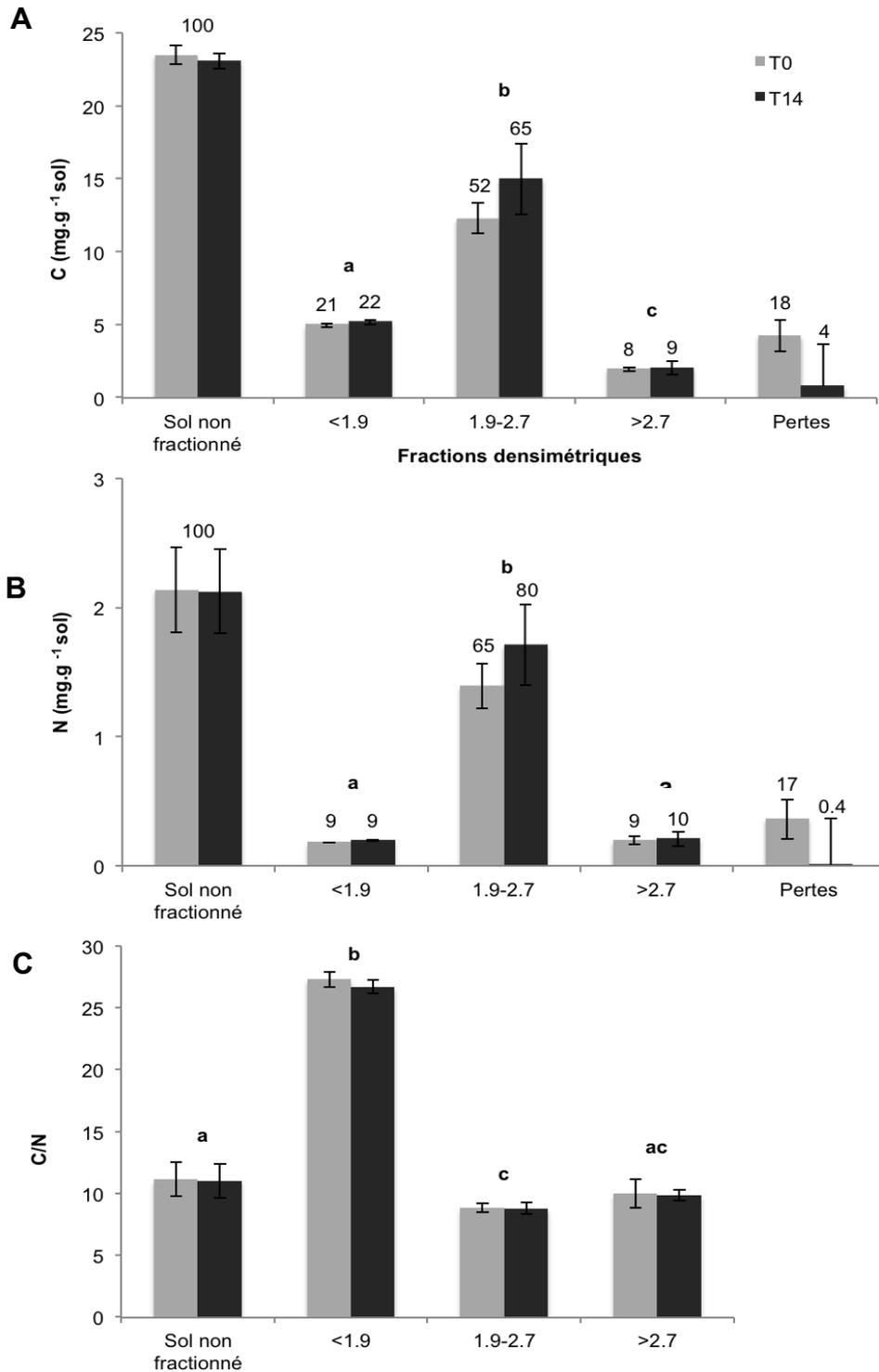
Minéral	Formule chimique	Densité (g.cm <sup>-3</sup> )	Bulk	1.9-2.7	>2.7
Quartz	SiO <sub>2</sub>	2,65	✓	✓	✓
Albite	NaAlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	2,62	✓	✓	✓
Microcline	KAlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	2,56	✓	-	✓
Kaolinite	Al <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub>	2,2 à 2,6	✓	-	✓
Illite	(K,H <sub>3</sub> O)(Al,Mg,Fe) <sub>2</sub> (Si,Al) <sub>4</sub> O <sub>10</sub> [(OH) <sub>2</sub> .(H <sub>2</sub> O)]	2,2 à 2,6	✓	✓	✓
Smectite	(Na,Ca) <sub>0,3</sub> (Al, Mg) <sub>2</sub> Si <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub> .nH <sub>2</sub> O	2 à 2.7	-	-	✓
Magnétite	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	5,18	-	-	✓
Hématite	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5,26	-	-	✓
Goethite	FeO(OH)	4,27 à 4,29	✓	✓	✓

Dans le **sol non-fractionné** de Joeuf, les phases minérales dominantes identifiées sont : le quartz et les feldspaths avec la microcline et l'albite. Mais aussi, même s'ils sont plus difficilement observables (pics d'intensité faibles), des phyllosilicates avec l'illite et la kaolinite, et un hydroxyde de fer avec la goethite.

Concernant la **fraction 1.9-2.7**, les minéraux dominants identifiés sont le quartz, l'albite (feldspath sodique) et l'illite.

Dans la fraction **>2.7**, sont retrouvés majoritairement des oxydes (magnétite et hématite) et des hydroxydes de fer (goethite) comme attendu. Toutefois, les feldspaths (essentiellement la microcline, feldspath potassique) sont encore observés dans cette fraction en plus de l'illite, la kaolinite et une smectite (montmorillonite)

2.2.1.3. Teneurs en carbone, azote total et rapport C/N



**Figure V-6.** (A) Teneurs en carbone et (B) en azote total ( $\text{mg.g}^{-1}\text{ sol}^{-1}$ ) et (C) rapports C/N pour le sol non fractionné et les différentes fractions densimétriques à T0 (en clair) et T14 (en foncé). *Les chiffres situés au-dessus de chaque barre d'histogramme représentent la proportion moyenne de chaque élément dans les fractions par rapport à la concentration initiale (sol non-fractionné). Les différences significatives ( $p < 0,05$ , ANOVA2) identifiées entre les sols sont annotées par des lettres (a, b, c). Aucune différence significative n'a été observée entre les temps T0 et T14.*

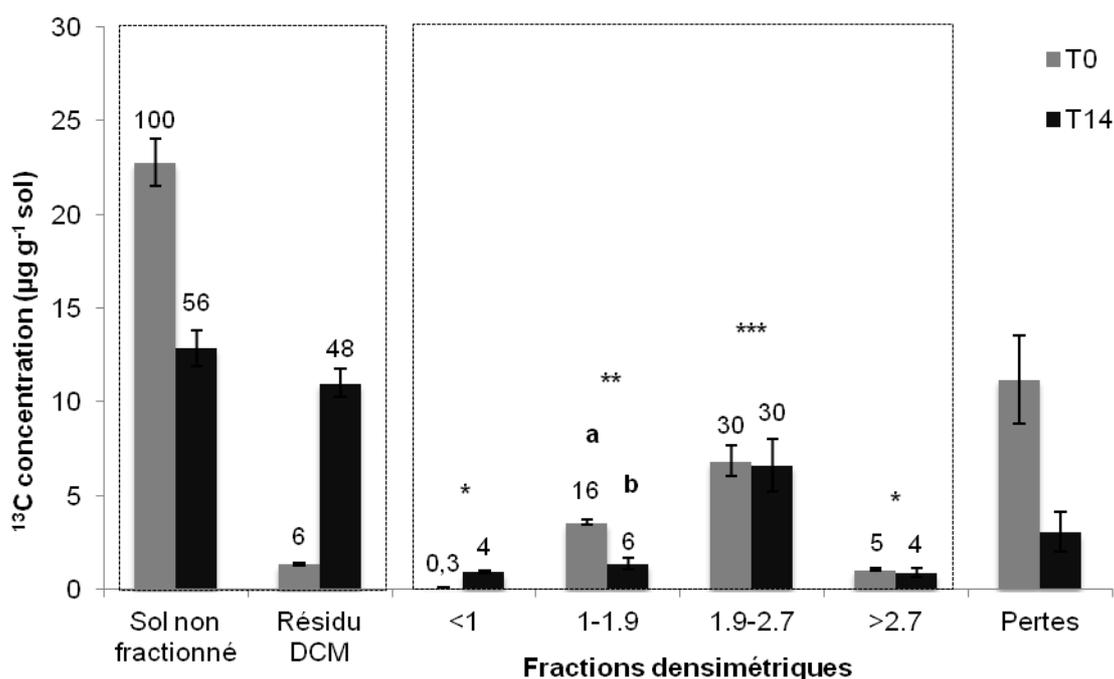
La distribution du carbone et de l'azote dans les différentes fractions densimétriques est présentée dans la **Figure V-6A**. Que ce soit pour le sol non fractionné ou les différentes fractions densimétriques, aucune différence significative n'est observée entre les valeurs mesurées à T0 et à T14. Ceci est vrai pour les teneurs en carbone, en azote et pour le rapport C/N.

Les teneurs en **carbone** les plus élevées sont retrouvées dans la fraction 1.9-2.7 avec en moyenne 50% du carbone total à T0 et 65% à T15. Dans la fraction <1.9, les concentrations en carbone à T0 et T14 représentent 20% de la concentration en carbone total et 10% environ dans la fraction >2.7. Les valeurs de carbone sont significativement différentes entre chacune des fractions densimétriques.

Pour l'**azote**, les concentrations les plus fortes sont retrouvées dans la fraction 1.9-2.7 avec 65% et 80% de l'azote total à T0 et à T14 respectivement. Elles diffèrent significativement des valeurs observées dans les fractions <1.9 et >2.7 qui correspondent à environ 10% des teneurs initiales.

Les pertes en carbone et azote calculées (*différence entre le sol non fractionné et la somme des fractions*) ne sont pas négligeables à T0 et T14 (environ 20%). Comme l'indique les écart-types, à T14 les valeurs entre replicats sont très hétérogènes.

Les valeurs du **rapport C/N** calculées pour le sol non-fractionné et les fractions densimétriques sont présentées dans la **Figure V-6B**. Aucune différence significative n'est observée entre les temps T0 et T14. Le rapport C/N le plus élevé est retrouvé dans la fraction légère 1-1.9 avec une valeur moyenne d'environ 28. Ce rapport est compris entre 10 et 15 dans le sol non fractionné et les fractions denses 1.9-2.7 et >2.7. Le rapport moyen calculé pour la fraction <1.9 est significativement différent de celui obtenu pour le sol non fractionné et les fractions 1.9-2.7 et >2.7. Le rapport C/N dans la fraction >2.7 n'est pas significativement différent de celui calculé pour la fraction 1.9-2.7 et le sol non-fractionné.

2.2.2. Répartition du  $^{13}\text{C}$ -PHE dans le sol et dans les fractions

**Figure V-7.** Distribution du  $^{13}\text{C}$  dans le sol non fractionné (bulk et résidu) et les différentes fractions densimétriques (exprimées en  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ). Les valeurs de pourcentage représentées au-dessus de chaque barre d'histogramme expriment la proportion de  $^{13}\text{C}$  par rapport à la quantité initiale mesurée après la contamination par le  $^{13}\text{C}$ -PHE (T0). Les différences significatives ( $p < 0,05$ , Anova2) observées entre les deux temps sont données par des lettres et entre les différentes fractions densimétriques par (\*).

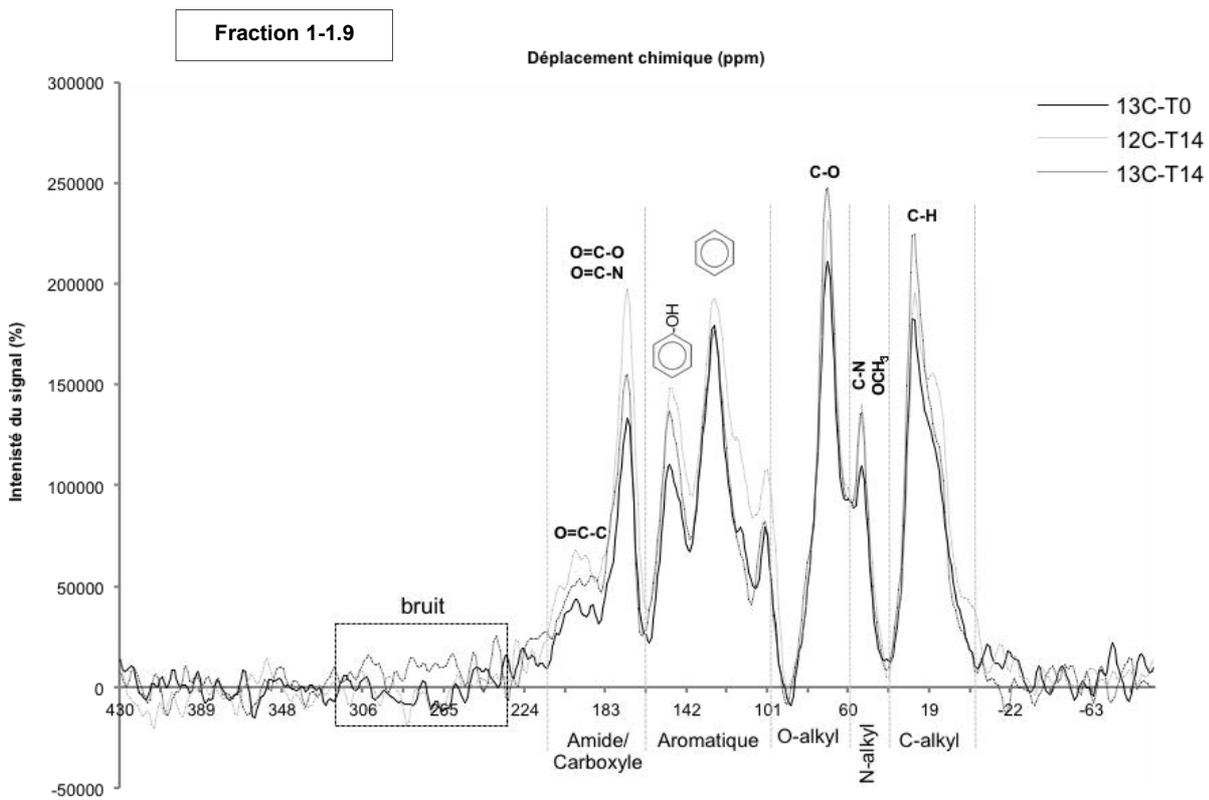
Les teneurs en  $^{13}\text{C}$  issu du phénanthrène marqué dans le sol non fractionné, dans le sol résiduel (après extraction au DCM) et dans les fractions densimétriques sont présentées dans la **Figure V-7**.

Au début de l'expérimentation (T0), la concentration en  $^{13}\text{C}$  est d'environ  $23 \mu\text{g g}^{-1}$  de sol et diminue significativement pour atteindre  $13 \mu\text{g g}^{-1}$  à T14. Cette diminution est corrélée avec l'augmentation significative du  $^{13}\text{C}$  dans le résidu DCM qui passe de  $1,3 \mu\text{g g}^{-1}$  à  $11 \mu\text{g g}^{-1}$  (voir Chapitre IV). Pour les fractions de sol, les teneurs les plus élevées en  $^{13}\text{C}$  sont retrouvées dans la fraction 1.9-2.7 avec environ  $7 \mu\text{g g}^{-1}$  à T0 et à T14 et représentent environ 30% du  $^{13}\text{C}$  initial. Dans la fraction MO non complexée 1-1.9, les teneurs sont de  $3,6 \mu\text{g g}^{-1}$  à T0 contre  $1,4 \mu\text{g g}^{-1}$  en moyenne à T14 et représentent respectivement 16 et 6% du  $^{13}\text{C}$  initial (mesuré à T0). C'est la seule fraction pour laquelle une différence significative est observée entre les temps T0 et T14. Pour les fractions  $<1$  et  $>2.7 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , les teneurs mesurées avoisinent  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  ( $\approx 5\%$ ) du  $^{13}\text{C}$  initial excepté dans la fraction  $<1$  où les teneurs sont inférieures à  $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$  ( $\approx 0,3\%$   $^{13}\text{C}$  initial) à T0. Cependant aucune différence significative n'est observée entre ces deux fractions, mais elles diffèrent significativement des fractions 1-1.9 et 1.9-2.7 qui sont elles-mêmes significativement différentes entre elles.

Les pertes de  $^{13}\text{C}$  induites par le fractionnement sont de  $11 \mu\text{g g}^{-1}$  à T0 et de  $3 \mu\text{g g}^{-1}$  à T14 et représentent respectivement 50% et 25% du  $^{13}\text{C}$  mesuré dans les sols non fractionnés T0 et T14.

### 2.2.3. Nature des produits de dégradation dans les fractions de sol par $^{13}\text{C}$ -RMN et TD/pyGCMS

#### 2.2.3.1. $^{13}\text{C}$ -RMN solide



**Figure V-8.** Spectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN à l'état solide pour les échantillons  $^{13}\text{C}$ -T0,  $^{12}\text{C}$ - et  $^{13}\text{C}$ -T14 de la fraction de densité 1-1.9  $\text{g.cm}^{-3}$ . Les régions principales identifiées sont attribuées aux groupements suivants : C-alkyle (0-45 ppm), O-alkyle (45-110 ppm), aromatique (110-160 ppm), carboxylique (160-210) (Kögel-Knabner, 1997).

Les spectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN produits pour la fraction 1-1.9 à T0 et à T14 (témoin et enrichi) sont présentés dans la **Figure V-8**. Aucune différence n'est observée entre les différents échantillons, et notamment entre les échantillons témoin et enrichi à 14 jours.

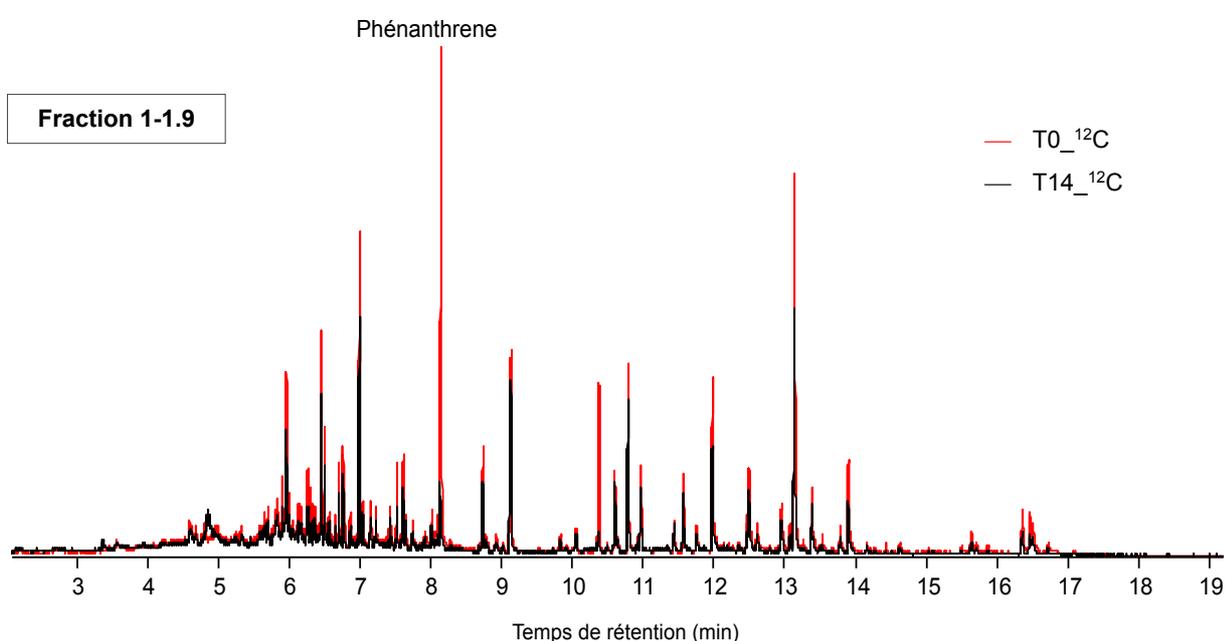
Le **Tableau V-2** présente l'intensité du signal pour chaque pic principal identifié pour les 3 spectres présentés dans la **Figure V-8**. Le rapport des pics obtenu à partir de la somme des carbones oxygénés (identifiés à 60-110, 140-160, 160-180 et 180-210 ppm) sur les

carbones engagés dans un noyau aromatique (110-140 ppm) a tendance à augmenter à 14 jours (pour l'échantillon témoin et enrichi) et passe de 2,7 à 3,4.

**Tableau V-2.** Intensité du signal (%) pour les pics principaux des spectres <sup>13</sup>C-T0, <sup>12</sup>C-T14 et <sup>13</sup>C-T14 de la fraction 1-1.9 et rapports de pics des composés oxygénés/aromatiques. ppm = unité du déplacement chimique ; oxy = oxygénés et arom = aromatique.

ppm	0-45	45-60	60-110	110-140	140-160	160-180	180-210	Σoxy	Rapport Σoxy/arom
Nature	C-H	C-N ou OCH3	C-O	arom	arom-OH	O=C-O	O=C-C		
<sup>13</sup> C-T0	182693	107663	207713	177234	108958	128397	36378	481446	<b>2,72</b>
<sup>12</sup> C-T14	195784	140445	231334	191024	148246	194248	65173	639001	<b>3,35</b>
<sup>13</sup> C-T14	223980	135832	246620	172097	134872	146414	47440	575346	<b>3,34</b>

### 2.2.3.2. TD-pyGCMS



**Figure V-9.** Comparaison des chromatogrammes obtenus après thermodésorption pour les échantillons de sol constituant la fraction 1-1.9 non marqué (<sup>12</sup>C-PHE) à 0 et 14 jours (les différents pics ont été identifiés Figure V-10).

Les chromatogrammes obtenus pour la fraction 1-1.9 témoin (<sup>12</sup>C-PHE) à T0 et à T14 sont présentés dans la **Figure V-9**. En comparant les chromatogrammes, aucun produit issu de la dégradation du PHE n'est visible, seule une diminution des pics principaux entre T0 et T14 est apparente. La baisse du PHE est très facilement identifiable entre 0 et 14 jours.

Le sol non fractionné à T0 et à T7 (<sup>12</sup>C-PHE et <sup>13</sup>C-PHE) a également été analysé en thermodésorption (données non présentées ici) avec un signal clairement dominé par le PHE qui diluerait celui des autres composés. A 7 jours, aucune différence n'est observée entre les deux échantillons (<sup>12</sup>C et <sup>13</sup>C-PHE). A l'exception du <sup>13</sup>C-PHE, il n'y a aucun composé marqué identifié et donc absence de possibles produits de dégradation visibles. En pyrolyse, le signal est très faible et il y a peu de produits identifiés à T0 et à T7. Compte tenu des

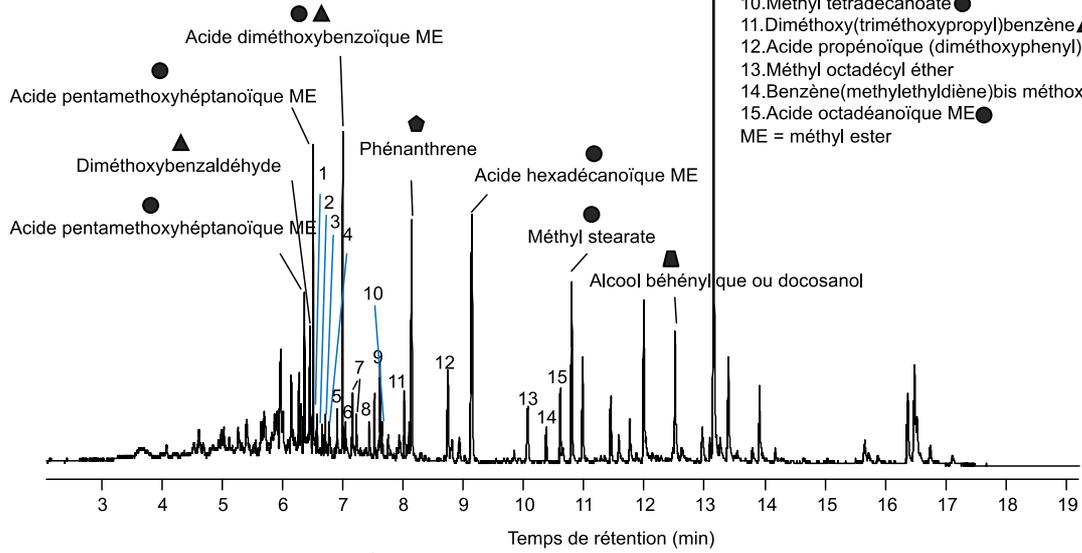
teneurs importantes en PHE, il serait préférable d'analyser le résidu d'extraction avec une prise d'essai plus importante.

**A – <sup>12</sup>C-T14, Fraction 1-1.9**

Origine des produits thermodesorbés :

- Acide carboxylique
- ▲ Dérivés phénoliques
- ▲ Alcool
- \* Hydrate de carbone
- ◆ HAP
- Acide organique
- ▲ Acide carboxylique aromatique

1. Acide dicarboxylique benzène diME ●
  2. Acide dodécanoïque ME ●
  3. Acide méthoxybenzène propanoïque ME ●▲
  4. Acide nonanedioïque diME + C3-Acide undécanoïque ME ●
  5. Acide quinique tétraMEther, ME ●
  6. Benzaldéhyde triméthoxy▲
  7. Diméthoxy(méthoxyéthényl)benzène▲
  8. Méthyl p-méthoxycinnamate, cis ●▲
  9. Acide triméthoxybenzoïque ME ●▲
  10. Méthyl tétradécanoate ●
  11. Diméthoxy(triméthoxypropyl)benzène▲
  12. Acide propénoïque (diméthoxyphényl)ME ●
  13. Méthyl octadécyl éther
  14. Benzène(méthylethylène)bis méthoxy▲
  15. Acide octadécanoïque ME ●
- ME = méthyl ester



**B – <sup>12</sup>C-T14, Fraction 1.9-2.7**

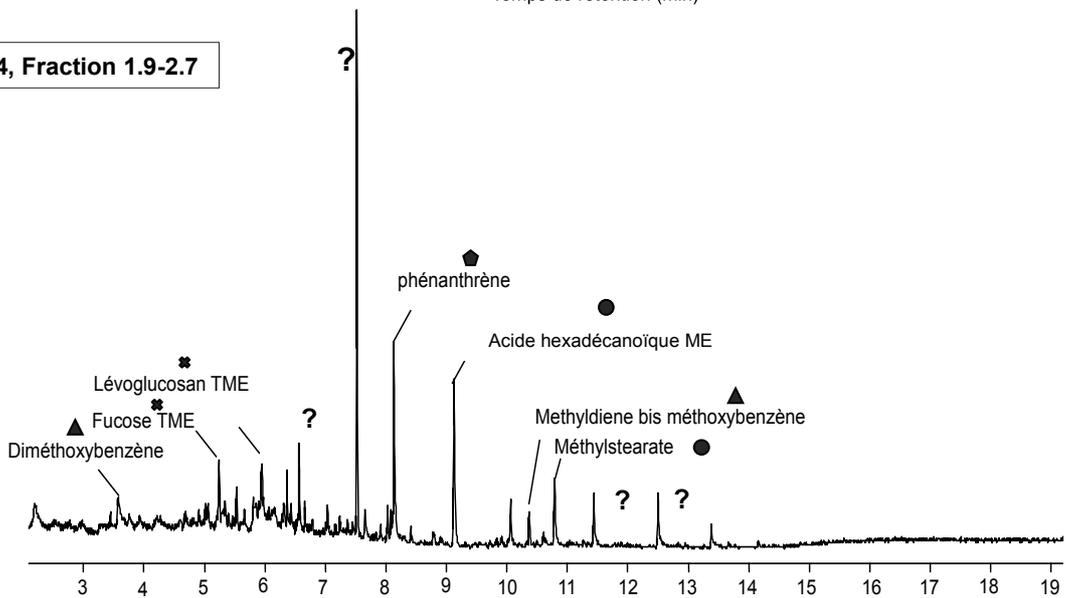


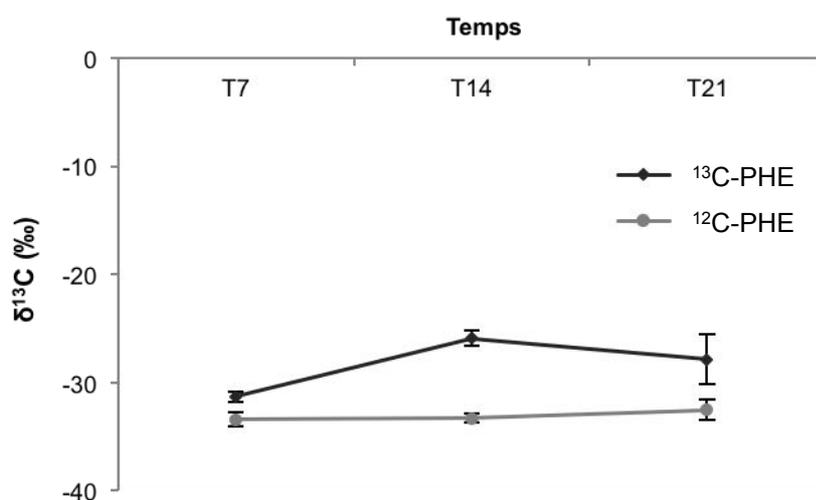
Figure V-10. Comparaison des chromatogrammes obtenus après thermodesorption des fractions (A) 1-1.9 (B) 1.9-2.7 issues de l'échantillon de sol non marqué (<sup>12</sup>C-PHE) à 14 jours.

La **Figure V-10** présente les chromatogrammes obtenus après thermodésorption des fractions densimétriques 1-1.9 et 1.9-2.7. Les produits associés à chaque pic et leurs origines respectives sont présentés pour chacun d'entre eux.

Sur la **Figure V-10A**, les produits de pyrolyse obtenus à partir de la **fraction 1-1.9** sont pour la majorité issus d'acides gras et d'acides carboxyliques aromatiques. Le phénanthrène est retrouvé aux alentours de 8 minutes. Quelques produits de dégradation éventuels ont été identifiés comme l'acide dicarboxylique benzène diméthyl ester, l'acide triméthoxybenzoïque méthyl ester et à 6,3 minutes le diméthyl phtalate. Cependant, sur la **Figure V-10** ( $^{12}\text{C}$ -fraction 1-1.9 à T0 et à T14), il n'y a pas d'apparition de nouveaux pics. Seule la diminution de chacun des pics après 14 jours est perceptible, dont celle du PHE qui est clairement identifiable. Sur la **Figure V-10B**, exclusivement quelques produits de pyrolyse sont identifiés dont des sucres avec le fucose par exemple, des acides gras avec l'acide hexadécanoïque et des dérivés phénoliques dont le diméthoxybenzène. Certains des pics n'ont pas pu être identifiés.

### 2.3. Analyse par IRMS ( $\delta^{13}\text{C}$ ) des extraits d'ADN obtenus à partir du sol brut

Les extraits d'ADN microbien à partir du sol brut témoin et du sol brut enrichi ont été analysés en IRMS, et les résultats sont présentés dans la **Figure V-11**.



**Figure V-11.** Déviation isotopique ( $\delta^{13}\text{C}$ ) pour les extraits d'ADN témoin (trait clair) et enrichi (trait foncé).

La déviation du rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  pour les échantillons témoins est en moyenne de -33‰ à 0, à 7 et à 14 jours. Pour les extraits enrichis, la déviation augmente et

passé d'environ -31‰ à -26 ‰ de 7 à 14 jours puis tend à diminuer à 21 jours pour atteindre approximativement -28‰. Il semblerait qu'une partie du  $^{13}\text{C}$  ait été incorporée dans l'ADN microbien après 14 jours, signal dilué ensuite puisque que le  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) diminue à 21 jours, mais reste supérieur à l'échantillon non enrichi (Témoin).

### 3. Discussion

#### 3.1. Répartition du $^{13}\text{C}$ -PHE dans la MO libre et les MO associées aux minéraux

La concentration en  $^{13}\text{C}$  la plus élevée a été mesurée dans la MO associée principalement au quartz, aux feldspaths et à l'illite aussi bien à T0 qu'à T14 où environ 30% du  $^{13}\text{C}$  initial issu du  $^{13}\text{C}$ -PHE est retrouvé. C'est aussi dans cette fraction que les teneurs retrouvées en carbone et en azote sont les plus élevées et le rapport C/N le plus bas ( $\approx 10$ ). La nature de la MO associée à ces phases minérales a probablement un rôle significatif à jouer dans la rétention du  $^{13}\text{C}$  compte tenu de l'importance de la nature des MO dans la sorption des HAP (Chefetz and Xing, 2009; Salloum et al., 2002). Les teneurs en  $^{13}\text{C}$  sont moins importantes dans la MO libre et pour la MO associée aux oxyhydroxydes de fer. Cette dernière présente les teneurs en C et en N les plus basses et un rapport ( $\approx 10$ ). Contrairement au rapport C/N élevé retrouvé dans la MO libre qui est le plus élevé ( $\approx 25$ ), celui déterminé pour les MO associées aux minéraux suggère la présence d'une matière organique de nature variée et donc d'une MO hétérogène entre la fraction légère ( $<1.9$ ) et les fractions denses (1.9-2.7 et  $>2.7$ ). D'après Monnier et al. (1962), la MO liée aux minéraux serait en grande partie évoluée (avec un C/N proche de 10) comme c'est le cas ici. En effet, les rapports calculés pour les fractions denses sont compris entre 10 et 12 en moyenne. D'après Golchin et al. (1995), les produits de dégradation issus de la MO récente dominent la MO liée aux minéraux. Ce qui suggère une MO plus ancienne et certainement plus stable formant les associations organo-minérales. La MO libre serait principalement constituée de débris végétaux. Effectivement, la MO non fixée à la fraction minérale du sol est généralement constituée par des apports récents de MO fraîche, donc peu évoluée associée à un rapport C/N élevé. D'après Skjemstad et al. (1994) l'accumulation de MO fraîche se fait dans la fraction

légère ( $<1.6$ ) avec des teneurs dominantes en composés dérivés des végétaux (polysaccharides, lignine, cutine, subérine...) (Sollins et al., 2005).

La différence significative entre les teneurs en  $^{13}\text{C}$  pour le sol non fractionné à T0 et à T14 n'est pas visible pour la MO associée aux minéraux (pour les deux fractions denses 1.9-2.7 et  $>2.7$ ). En effet, à 14 jours dans le sol non fractionné, près de 40% du  $^{13}\text{C}$  présent initialement (T0) a été dissipé. Cette différence, en revanche, est perceptible dans la MO libre (1-1.9) où en moyenne 16% du  $^{13}\text{C}$  initial a été retrouvé à T0 contre 6% à T14. La MO « extraite à l'eau froide » ( $<1$ ) présente une faible proportion en  $^{13}\text{C}$ , cependant à T14 la concentration semble légèrement supérieure à T0 mais n'est pas significativement différente. De même pour les teneurs de la fraction concentrant les oxyhydroxydes de fer qui sont  $\leq$  à 5%.

Le pourcentage de  $^{13}\text{C}$  ( $\approx 30\%$ ) reste constant dans la fraction MO associée au quartz, aux feldspaths et à l'illite entre T0 et T14. De même pour la MO essentiellement liée aux oxyhydroxydes de fer ( $\approx 5\%$ ). L'absence de différence significative entre les teneurs de  $^{13}\text{C}$  à T0 et à T14 pour les MO associées aux minéraux laisse supposer que les assemblages organo-minéraux peuvent jouer un rôle de protection vis-à-vis des composés marqués issus du  $^{13}\text{C}$ -PHE. Le  $^{13}\text{C}$  lié aux associations organo-minérales serait davantage fixé par rapport au  $^{13}\text{C}$  associé à la MO libre. Il se sorberait rapidement sur les particules organo-minérales 1.9-2.7 pour s'y retrouver fortement lié au cours du temps et y former les  $^{13}\text{C}$ -résidus liés. Dans notre étude, environ 45% du  $^{13}\text{C}$  issu du PHE marqué a été retrouvé sous formes liés (fraction non-extractible) à la fin de l'expérimentation. A 14 jours, pour l'ensemble des fractions 44% de  $^{13}\text{C}$  issu du phénanthrène marqué a été atteint en moyenne. Cette proportion est comparable à celle retrouvée dans le résidu de sol et supposerait que la majorité du  $^{13}\text{C}$  non extractible se concentrerait dans les associations organo-minérales du sol, et principalement au sein de la fraction dense 1.9-2.7.

La majorité du  $^{13}\text{C}$  serait donc liée à la MO principalement associée au quartz, aux feldspaths, et à l'illite ayant le rapport C/N le plus bas. La diminution du rapport C/N avec l'augmentation de la densité des particules minérales peut être expliquée, au moins partiellement, par la sorption de composés azotés (acides aminés, osamines, bases azotées, hétérocycles azotés) directement à la surface des minéraux. D'après Aufdenkampe et al. (2001), la MO associée aux minéraux présente un rapport C/N aux alentours de 7-14, probablement dû à un haut pouvoir de sorption des protéines sur les surfaces minérales (Chevallier et al., 2003; Wershaw, 2004). Aussi, Kleber et al. (2007) suggèrent que les

matières organiques riches en azote peuvent jouer un rôle majeur dans la formation et la structure des associations organo-minérales par leur abondance et leur capacité à se sorber irréversiblement sur les surfaces minérales. Sollins et al. (2005) ont montré une augmentation du temps de résidence moyen des composés organiques avec la densité des particules.

Dans la MO libre, le  $^{13}\text{C}$  associé serait plus labile et donc plus facilement perdu lors du fractionnement densimétrique contrairement au  $^{13}\text{C}$  lié aux associations organo-minérales qui auraient un rôle plus protecteur vis-à-vis de la matière organique.

### 3.2. Identification des composés marqués issus du $^{13}\text{C}$ -PHE dans le sol

#### 3.2.1. Identification des composés marqués associés à la MO libre

La MO non associée aux phases minérales a été obtenue par fractionnement densimétrique. Pour la MO libre analysée en  $^{13}\text{C}$ -RMN solide, aucun composé marqué issu du  $^{13}\text{C}$ -PHE n'est visible. Les pics majoritaires identifiés pour les différents spectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN correspondent aux régions de déplacement chimique : 0-40 ppm, 40-60 ppm, 60-80 ppm, 100-140 ppm, 140-160 ppm, 160-180 ppm, 180-210 ppm correspondant respectivement aux groupements C-alkyle, N-alkyle ou méthoxy, O-alkyle, aromatique, phénolique, carboxyle/amide et carbonyle. Aucune différence n'a été observée entre les différents spectres, en revanche le rapport des pics  $\Sigma$ oxygénés/aromatiques passe de 2,7 à T0 à 3,4 à T14 suggérant une augmentation possible des composés oxygénés et donc potentiellement des métabolites issus de la biodégradation du PHE par les microorganismes (malgré l'absence de produits marqués identifiés certainement trop dilués). Effectivement, les principaux composés issus de la biodégradation des HAP sont des alcools, acides carboxyliques, composés dihydrodiols, des quinones. Dans une étude de Käcker et al. (2002), plusieurs métabolites issus du PHE marqué ont été identifiés en  $^{13}\text{C}$ -CPMAS-RMN tels que l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque, l'acide ortho-phtalique et l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque. De plus, les composés phénoliques produits après oxydation des HAP ont un fort potentiel pour s'adsorber à la matrice organique du sol.

Aussi, aucune différence n'a été observée pour la MO non complexée ( $^{12}\text{C}$ -PHE) en thermodésorption entre l'échantillon à T0 et à T14. Aucun nouveau pic n'a été identifié et donc aucun produit néoformé n'est remarqué. La seule observation notable est la diminution de chacun des pics identifiés à 14 jours. A l'exception du PHE, les pics observés sur le chromatogramme seraient des composés issus de la MO d'origine naturelle. Dans ces

conditions, que ce soit en  $^{13}\text{C}$ -RMN, en thermodésorption ou en pyrolyse il n'a pas été possible d'identifier de composés issus du phénanthrène dans le sol même après traitement par la méthode de fractionnement par densimétrie. En cause, sans doute, le signal important détecté pour le phénanthrène en TD/pyGCMS et la concentration trop faible en  $^{13}\text{C}$  ajoutée au sol pour l'expérimentation.

De plus, le fer n'est pas seulement présent sous forme d'oxyhydroxydes mais aussi dans les minéraux argileux comme l'illite identifiée dans la fraction 1.9-2.7 qui peut être à l'origine de l'absence de signal en  $^{13}\text{C}$ -RMN dû à un ratio C/Fe faible. Au sein des fractions denses les phases minérales sont très présentes et diluent la matière organique, et les techniques de spectrométrie et de spectroscopie requièrent des teneurs en carbone relativement élevées pour pouvoir caractériser les composés organiques présents. Il aurait été envisageable de coupler la méthode physique de fractionnement à un traitement chimique, comme l'utilisation d'acide fluorhydrique pour dissoudre les phases minérales. Mais cette méthode ne garantit pas l'absence de dissolution et de modification des MO, et encore l'absence de fractionnement isotopique. La perte de certains composés, au cours d'un tel traitement, comme les polysaccharides par exemple n'est pas à exclure d'après Preston et al. (1989) et Schmidt et al. (1997). En effet, plusieurs composés organiques complexés peuvent être solubilisés lors de la dissolution des phases minérales (Eusterhues et al., 2007).

Les acides hexadécanoïque, octadécanoïque et stéarique identifiés sur les chromatogrammes sont des acides gras couramment retrouvés chez les bactéries (Kaneda, 1991) mais les acides hexadécanoïque et octadécanoïque peuvent non seulement refléter une importante contribution des bactéries mais aussi des végétaux (Réveillé et al., 2003).

A 14 jours, environ 45% du  $^{13}\text{C}$  issu du PHE marqué est retenu dans le résidu DCM, et n'est probablement plus sous la forme de  $^{13}\text{C}$ -PHE mais sous la forme de  $^{13}\text{C}$ -métabolites associés aux constituants du sol ou de  $^{13}\text{C}$  incorporé dans la biomasse des cellules microbiennes. En effet, à 14 jours les composés néoformés sont très probablement plus polaires et donc plus réactifs pour former des résidus liés mais aussi plus solubles ce qui expliquerait le pourcentage légèrement plus haut ( $\approx 4\%$ ) dans la fraction MO hydrosoluble ( $<1$ ) qui est  $<1\%$  à T0. Dans le but d'identifier une partie des composés marqués et retenus dans le résidu DCM, nous avons entrepris d'extraire à nouveau une partie de la MO toujours par extraction accélérée mais à l'eau dans le cas présent.

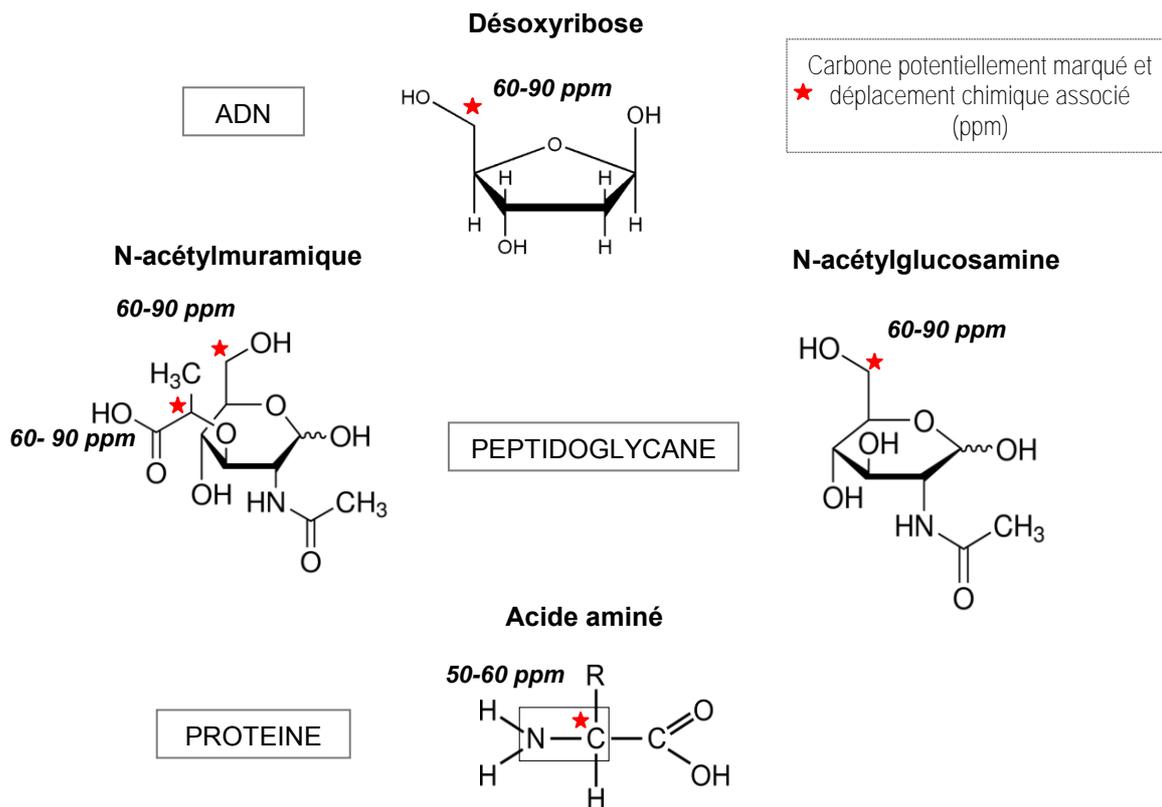
### 3.2.2. Identification des composés marqués après extraction à « l'eau chaude » du résidu DCM.

En comparant les résidus DCM et EAU, des différences significatives ont été observées à 7 et à 14 jours pour les teneurs en N et le rapport C/N. Les concentrations en N sont plus faibles dans le résidu EAU que dans le résidu DCM, ce qui induit une augmentation du rapport C/N dans le résidu EAU à 7 et à 14 jours. Ceci suggère que les composés extraits à « l'eau chaude » sont très probablement, pour la plupart, des composés azotés tels que des acides aminés, des bases azotées ou même des sucres aminés (osamines).

En regardant les spectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN liquide obtenus pour l'extrait aqueux marqué et l'extrait témoin, plusieurs groupes fonctionnels caractéristiques ont été identifiés par rapport aux déplacements chimiques. En effet, des différences ont été observées à hauteur de certains déplacements chimiques, essentiellement entre 50 et 100 ppm, et montrent qu'une partie de la MO hydrosoluble est marquée au  $^{13}\text{C}$ . Les pics qui ont été mis en évidence sur le spectre obtenu pour l'extrait enrichi se trouvent : (i) à 50-60 ppm où ils sont attribués aux groupements N alkyle (C-N) et/ou méthoxy ( $\text{OCH}_3$ ) (ii) à 60-75 ppm et (iii) aux alentours de 90 ppm, déplacements chimiques attribués au groupe O alkyle (C-O). Une partie du carbone marqué a pu se retrouver incorporée dans des composés organiques possédant dans leur environnement chimique un ou des atome(s) d'azote et/ou d'oxygène. Ces résultats coïncident avec la diminution des teneurs en azote dans le résidu EAU, et l'extraction apparente de composés riches en azote.

Parmi les composés de synthèse incorporés dans la biomasse microbienne du sol, Golchin et al. (1996) ont suggéré une dominance des groupes C-alkyle, O-alkyle et carbonyle ( $\text{C}=\text{O}$ ) à l'opposé très peu de structures aromatiques et phénoliques ont été détectées. Le carbone marqué a donc pu être incorporé dans certains constituants des cellules microbiennes tels que des sucres, des acides aminés mais aussi des lipides non identifiables dans ces conditions, ces derniers étant hydrophobes.

Les membranes cellulaires des bactéries contiennent des sucres aminés (glucosamines) tels que le N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique, deux constituants majeurs de la couche de peptidoglycane.



**Figure V-12.** Exemple de composés organiques constitutifs des cellules bactériennes susceptibles d'être retrouvés dans l'extrait aqueux analysé en  $^{13}\text{C}$ -RMN liquide.

Les composés identifiés dans l'extrait aqueux par  $^{13}\text{C}$ -RMN liquide peuvent correspondre à des constituants microbiens comme, par exemple, (i) des acides aminés (liaison peptidique) ou (ii) des oses, comme le ribose (élément constitutif des nucléotides) ou les sucres aminés composant le peptidoglycane (**Figure V-12**). Richnow et al. (2000) ont identifié du C dérivé du PHE transformé par des processus anaboliques microbiens en composés typiques (représentatif d'organisme biologique).

En complément, d'après les mesures d'enrichissement ( $\delta^{13}\text{C}$ ) sur les extraits d'ADN à 14 jours il semblerait qu'il y ait une incorporation du  $^{13}\text{C}$  dans l'ADN, qui mériterait d'être approfondie.

## 4. Conclusion

La distribution du  $^{13}\text{C}$  au sein des associations organo-minérales n'est pas aléatoire et dépend de la nature des phases minérales et des MO les formant. Il semblerait que la MO associée au quartz, aux feldspaths et à l'illite soit davantage constituée de composés azotés

issus de MO dégradée et plus stable comparée à la fraction MO non complexée aux minéraux qui serait dominée par de la MO fraîche et plus labile. Le  $^{13}\text{C}$  issu du PHE marqué est retrouvé majoritairement associé aux particules organo-minérales avec environ 35% du  $^{13}\text{C}$  initial à 14 jours contre 6% du  $^{13}\text{C}$  concentré dans la MO libre. Toujours est-il que la MO associée aux phases minérales est prédominante en termes de masse, contrairement à la MO libre qui ne représente même pas 5% de la masse totale.

Les traitements appliqués sur le sol brut et sur le résidu DCM ont permis d'analyser les différentes fractions en  $^{13}\text{C}$ -RMN solide, thermodésorption et pyGCMS et l'extrait aqueux en  $^{13}\text{C}$ -RMN liquide. Malgré tout, les seuls composés marqués issus du  $^{13}\text{C}$ -PHE identifiés sont ceux retrouvés dans l'extrait aqueux. Ils peuvent être attribués à des constituants cellulaires d'origine bactérienne principalement des molécules azotées, mais aussi des polysaccharides.

Les méthodes de traitement utilisées ici restent à développer afin d'améliorer la performance des outils analytiques dans ce type d'étude. En revanche, ces méthodes ont permis d'apporter davantage d'informations concernant la localisation du carbone marqué issu du  $^{13}\text{C}$ -PHE dans le sol. La méthode de fractionnement par densimétrie utilisée en parallèle d'expérimentation avec un traçage isotopique, comme c'est le cas ici, pourrait être associée à la technique NanoSIMS par exemple pour améliorer la compréhension du comportement des HAP dans les sols. En effet, le  $^{13}\text{C}$  mesuré dans les différentes fractions organo-minérales pourrait être localisé à une échelle très fine, ce qui permettrait d'approfondir les informations concernant le devenir des HAP dans les sols et de mettre en évidence leur association préférentielle ou non à la MO. Pour identifier d'éventuels métabolites, les résidus DCM pourraient être analysés en pyGCMS puisque la totalité ou la quasi-totalité du PHE devrait avoir été extrait et ne dominerait plus en termes de signal par rapport aux autres composés présents.

**Chapitre VI. Influence des  
associations organo-minérales  
dans la rétention des HAP  
dans les sols pollués**



## 1. Introduction

La MO du sol joue un rôle important dans la sorption des HAP dans l'environnement (Chefetz and Xing, 2009; Feng et al., 2006; Murphy et al., 1994; Salloum et al., 2002; Wang and Xing, 2005) mais les caractéristiques de la MO du sol ne peuvent pas être utilisées seules pour déterminer ou prédire le comportement des HAP dans les sols (Bonin and Simpson, 2007; Kopinke et al., 2001; Simpson et al., 2003). En effet, d'autres études ont aussi mis en exergue l'importance des phases minérales dans ces processus de rétention des HAP dans les sols (Biache et al., 2015; Müller et al., 2007) et ont aussi montré l'importance des assemblages organo-minéraux dans la rétention de contaminants organiques (Feng et al., 2006; Murphy et al., 1992) suggérant que les minéraux influencent la conformation de la MO du sol et l'accessibilité aux domaines de sorption (Feng et al., 2006; Simpson and Johnson, 2006). Quelques auteurs ont étudié l'influence de la taille des particules organo-minérales sur la distribution des HAP dans un sol (Li et al., 2010; Pernot et al., 2013; Uyttebroek et al., 2006) en utilisant une méthode de fractionnement granulo-densimétrique.

Un des objectifs majeurs de ce travail de thèse était d'étudier l'influence des associations organo-minérales dans la rétention des HAP. Mais contrairement aux travaux d'Amellal et al. (2001) et Pernot et al. (2013) qui ont mis en avant l'influence de la structure du sol et de la distribution de taille des classes minéralogiques sur le comportement des HAP, nous avons choisi d'axer l'étude sur l'impact des phases minérales sur leur dynamique en utilisant une méthode de séparation par densimétrie.

La procédure de fractionnement a été appliquée à un sol historiquement contaminé qui a reçu ou non une contamination fraîche (**Figure VI-1**). Le choix d'un sol historiquement contaminé rend compte de la complexité d'un sol industriel, et en particulier de la notion de vieillissement de la pollution et permet de se rapprocher au mieux des situations réelles. L'utilisation du même sol avec ou non ajout d'un extrait organique provenant de ce sol a permis de réaliser une comparaison entre une contamination disponible et non. Comme décrit dans le Chapitre II, la procédure de séparation densimétrique appliquée, adaptée de la méthode utilisée par Basile-Doelsch et al. (2007); de Junet et al. (2013), a permis de séparer le sol en MO libres (fraction légère) et en MO associées aux minéraux (fraction dense) en utilisant une solution de polytungstate de sodium. Des analyses pour quantifier les HAP par UHPLC, des analyses minéralogiques pour l'identification des phases minérales par DRX, la

mesure des surfaces spécifiques par la méthode BET, et des analyses élémentaires ont été réalisées pour caractériser les différentes fractions densimétriques obtenues.

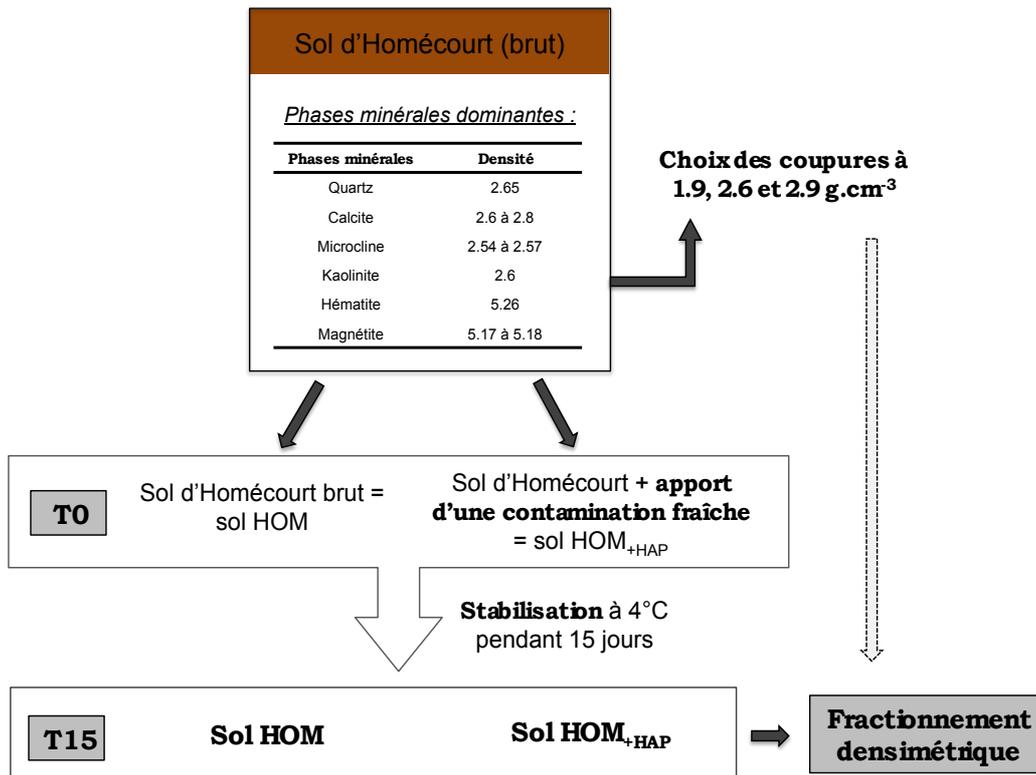
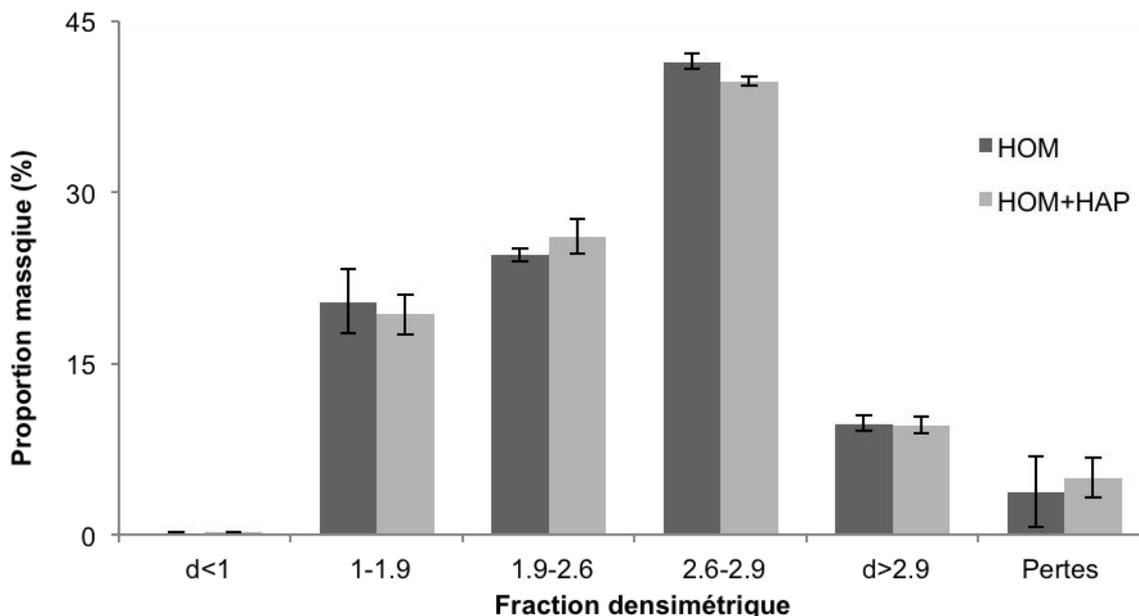


Figure VI-1. Schéma résumant les points essentiels de l'expérimentation sur le sol industriel.

## 2. Résultats

### 2.1. Répartition massique des fractions densimétriques

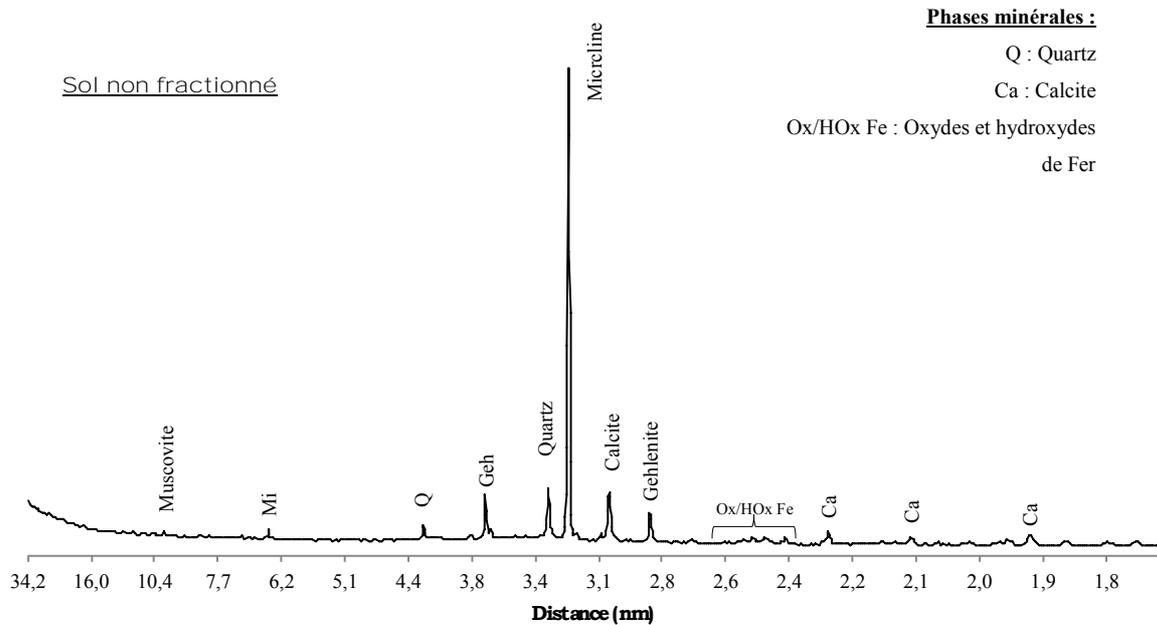


**Figure VI-2.** Répartition en masse des différentes fractions densimétriques pour la terre d'Homécourt (HOM) et la même terre enrichie en HAP avec un extrait organique (HOM<sub>+HAP</sub>).

La distribution massique de l'ensemble des fractions densimétriques obtenues est présentée dans la **Figure VI-2**. La perte de matières induites lors des séparations densimétriques n'est pas négligeable et semble très proche pour les deux conditions (HOM et HOM<sub>+HAP</sub>). Elle correspond à 5% environ de la masse initiale de sol sec. La fraction qui domine en termes de masse est la fraction 2.6-2.9 g.cm<sup>3</sup> (unité qui ne sera plus précisée par la suite), qui représente approximativement 40% du matériel collecté. Elle est suivie de la fraction 1.9-2.6 représentant approximativement 25% de la masse initiale. La fraction libre est bien représentée avec environ 20% de matière organique non complexée récoltée. Les particules organo-minérales collectés dans la fraction d>2.9 sont les moins représentées en termes de masse avec un peu plus de 10% de la masse totale. Dans chacun des cas, aucune différence n'est observée entre le sol brut (HOM) et recontaminé (HOM<sub>+HAP</sub>)

## 2.2. Identification des phases minérales (DRX)

L'analyse minéralogique a été réalisée par diffraction aux rayons X pour le sol non fractionné suivie par l'analyse de chacune des fractions densimétriques (**Figure VI-3 et VI-4**).



**Figure VI-3.** Diffractogramme des rayons X obtenu pour le sol d'Homécourt (HOM<sub>+HAP</sub>) non-fractionné.

La **Figure VI-3** présente le diffractogramme obtenu pour le sol d'Homécourt non-fractionné. Les phases minérales identifiables sont : les feldspaths avec la microcline, la calcite, le quartz et la gehlénite. Les oxydes de fer et les phyllosilicates (muscovite) sont aussi présents mais faiblement détectés. Les diffractogrammes semblent similaires pour les deux conditions HOM (données non présentées) et HOM<sub>+HAP</sub>. Les résultats présentés **Figures VI-3 et VI-4** sont uniquement ceux obtenus pour la condition HOM<sub>+HAP</sub> (les diffractogrammes pour la condition HOM sont présentés en annexes).

Fractions

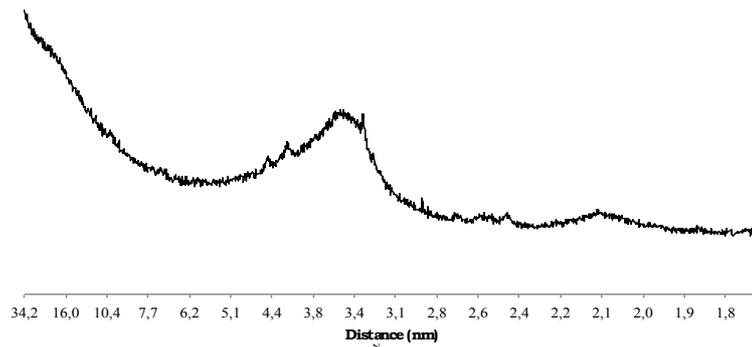
densimétriques :

Phases minérales :

- Q : Quartz
- Ca : Calcite
- Geh : Gehlenite
- Mi : Microcline
- Mu : muscovite
- Ka : Kaolinite
- H : Hematite

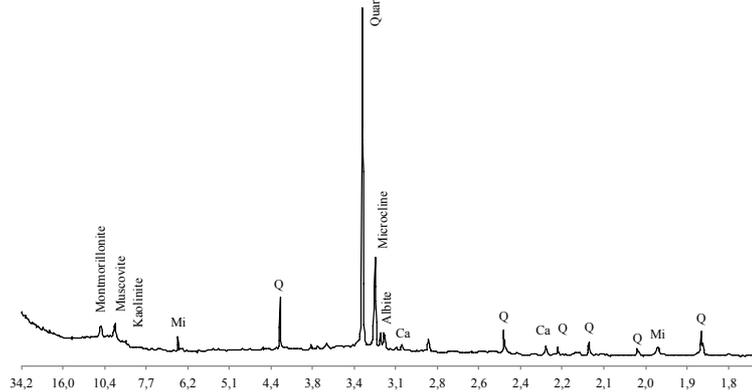
1.9-2.6

Quartz  
Feldspaths



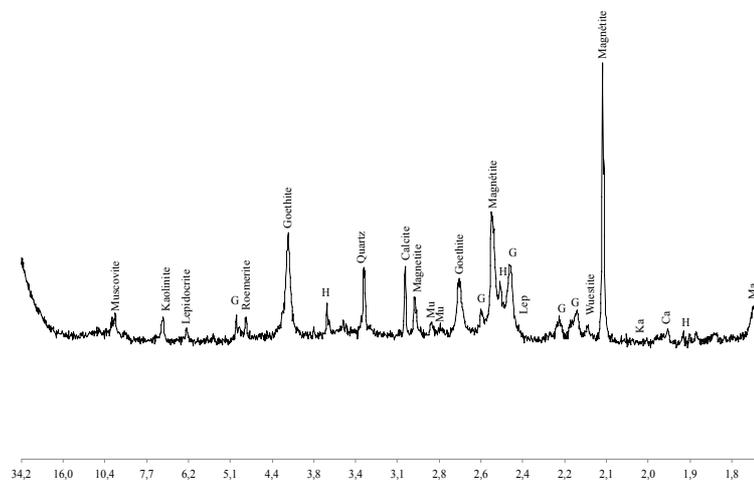
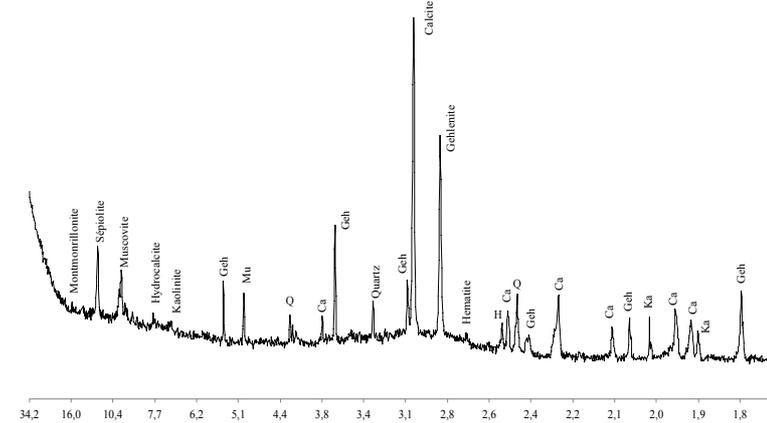
2.6-2.9

Calcite  
Gehlenite



>2.9

Magnétite  
Goethite



**Figure VI-4.** Diffractogrammes des rayons X obtenus pour les différentes fractions densimétriques du sol d'Homécourt (HOM<sub>HAP</sub>).

La **Figure VI-4** présente les diffractogrammes obtenus pour chaque fraction aux densités croissantes : 1-1.9 ; 1.9-2.6 ; 2.6-2.9 et >2.9. Pour la fraction 1-1.9, nous n'observons pas de pics distincts ce qui montre l'absence de phases minérales cristallisées. D'après le diffractogramme obtenu pour la fraction 1.9-2.6, les phases minérales qui dominent sont le quartz, les feldspaths et les phyllosilicates. Les phases minérales majoritaires dans la fraction 2.6-2.9 sont les phyllosilicates, la calcite, la gehlénite, et le quartz qui est toujours présent (ubiquiste car un des minéraux le mieux cristallisé). Concernant la fraction  $d > 2.9$ , les phases minérales qui prédominent sont les oxydes et hydroxydes de fer mais le quartz et la gehlénite sont encore retrouvés.

L'analyse minéralogique obtenue montre la dominance d'un ou plusieurs types de minéraux dans chaque fraction (**Tableau VI-1**) :

- 1.9-2.6 : le quartz, les feldspaths et les phyllosilicates
- 2.6-2.9 : la calcite, la gehlénite et les phyllosilicates
- >2.9 : les oxydes de fer.

**Tableau VI-1.** Phases minérales observées dans les différentes fractions densimétriques du sol  $HOM_{+HAP}$  après diffractions des rayons X

Minéral	Formule chimique	Densité (g.cm <sup>-3</sup> )	1.9-2.6	2.6-2.9	>2.9
Quartz	SiO <sub>2</sub>	2,65	+++	+	+
Feldspaths	(Na,K)AlO <sub>2</sub> (SiO <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	2,57 à 2,76	+++	-	-
Gehlenite	Ca <sub>2</sub> Al(AlSi)O <sub>7</sub>	2,9 – 3,07	-	+++	-
Calcite	CaCO <sub>3</sub>	2,71	++	+++	++
Kaolinite	Al <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub>	2,2 à 2,6	+	+	+
Smectite	(Na,Ca) <sub>0,3</sub> (Al, Mg) <sub>2</sub> Si <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub> ·nH <sub>2</sub> O	2 à 2,7	++	+	-
Muscovite	KAl <sub>2</sub> (AlSi <sub>3</sub> O <sub>10</sub> )(OH) <sub>2</sub>	2,8 à 3,0	++	++	+
Magnétite	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	5,18	-	-	+++
Lepidocrocite	FeO(OH)	4	-	-	+
Hématite	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5,26	-	+	+
Goethite	FeO(OH)	4,27 à 4,29	-	-	+++

(+++): Phases minérales majoritaires ; (++) phases minérales présentes ; (+) phases minérales détectées ; (-) : phases minérales non détectées.

### 2.3. Estimation des surfaces spécifiques

Les surfaces spécifiques ont été mesurées pour le sol non-fractionné à T0 (T0\_HOM) et pour chaque fraction densimétrique des sols HOM et HOM<sub>+HAP</sub> à l'aide de la méthode BET (décrite dans le Chapitre II). Les résultats sont consignés dans le **Tableau VI-2**.

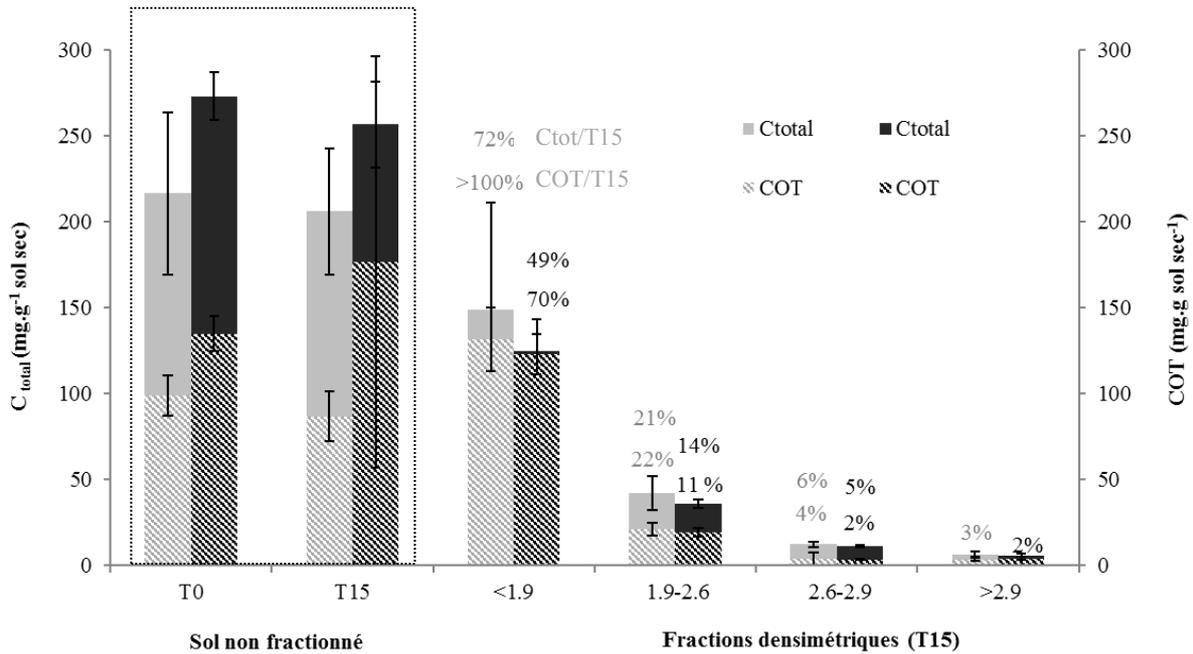
**Tableau VI-2.** Valeurs des surfaces spécifiques déterminées par la méthode BET pour les sols non-fractionnés HOM et HOM<sub>+HAP</sub> et les fractions densimétriques. L'écart ( $\pm$ ) donné ici correspond à l'erreur commise lors du traitement des données par application de la méthode BET.

ECHANTILLONS (dégazage à 30°C)	SURFACE SPECIFIQUE (m <sup>2</sup> /g)
T0_HOM	4.6 ± 1.1
1-1.9_HOM	3.0 ± 2.1
1.9-2.6_HOM	6.9 ± 0.7
1.9-2.6_HOM <sub>+HAP</sub>	4.1 ± 1.1
2.6-2.9_HOM	2.8 ± 1.2
2.6-2.9_HOM <sub>+HAP</sub>	2.2 ± 0.9
>2.9_HOM	14.1 ± 4.4
>2.9_HOM <sub>+HAP</sub>	11.7 ± 4.9

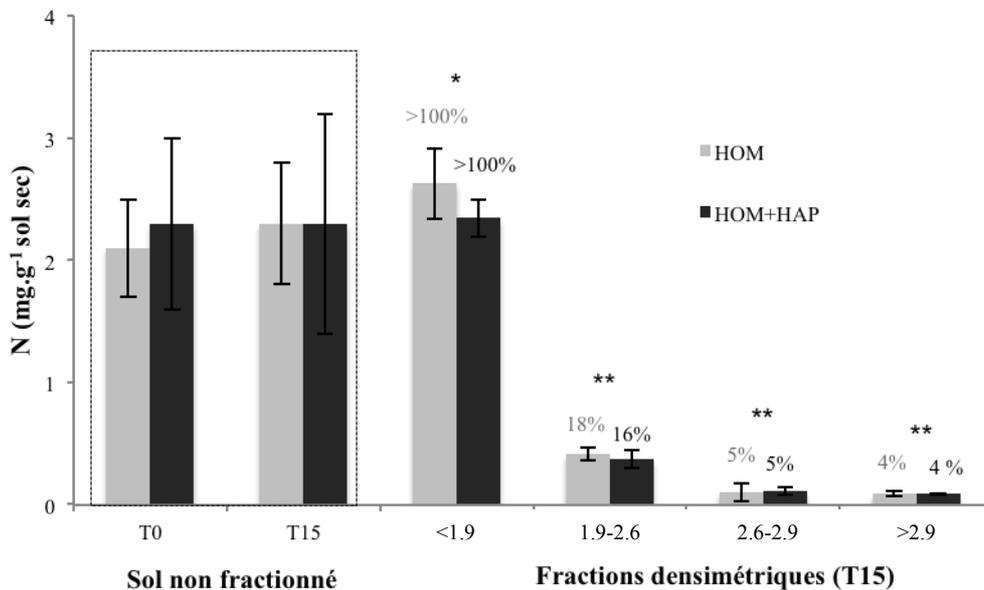
□

La surface spécifique mesurée dans le sol non fractionné d'Homécourt est faible avec 4,6 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> en moyenne. Concernant les fractions densimétriques, les surfaces spécifiques sont assez disparates avec des valeurs relativement élevées observées pour la fraction 1.9-2.6 mais davantage pour la fraction >2.9, et ceci est vrai pour les deux sols HOM et HOM<sub>+HAP</sub>. Cependant, les surfaces mesurées pour le sol HOM<sub>+HAP</sub> sont moins importantes que pour le sol HOM dans les deux cas. La fraction 2.6-2.9 montre une différence qui semble moins prononcée mais présente pour les deux sols une valeur de surface spécifique faible comme c'est le cas pour la MO libre (1-1.9). La densité n'intervient pas puisque les valeurs de surfaces spécifiques classées par ordre décroissant sont : 2.9 > 1.9-2.6 > 2.6-2.9 > 1-1.9.

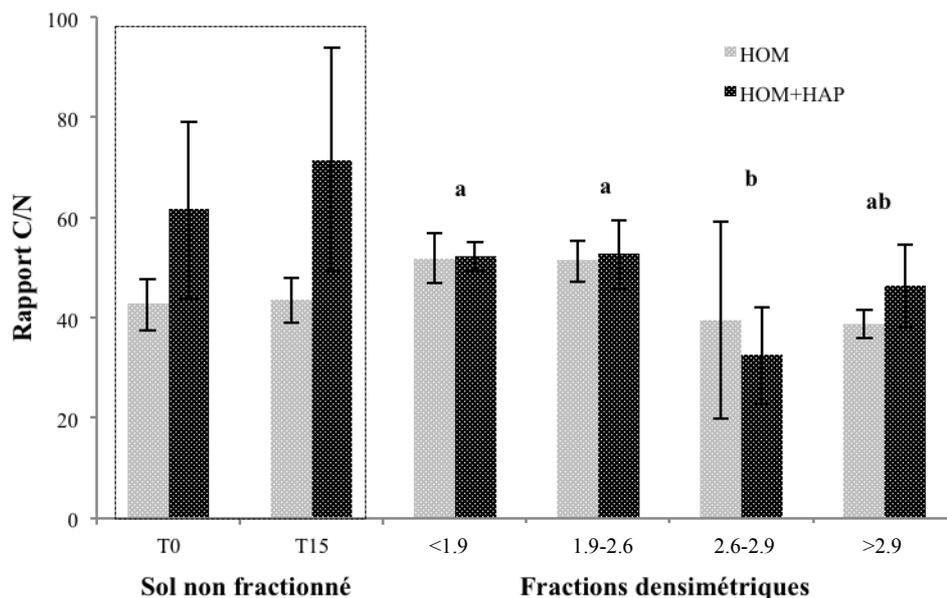
## 2.4. Distribution du carbone ( $C_{total}$ et COT) et de l'azote (N).



**Figure VI-5.** Distribution du carbone total (histogramme plein) et du carbone organique total (histogramme motif) dans le sol non fractionné avant (T0) et après (T15) stabilisation et dans les fractions densimétriques (exprimées en g.cm<sup>-3</sup>) pour les sols HOM (gris) et HOM+HAP (noir). (%) Les valeurs de pourcentage représentent la part de chaque fraction pour chaque condition par rapport aux teneurs initiales.



**Figure VI-6.** Distribution de l'azote total dans le sol non fractionné avant (T0) et après (T15) stabilisation et entre les fractions densimétriques pour les sols HOM (gris) et HOM+HAP (noir). (%) Les pourcentages représentent la part de chaque fraction pour chaque sol/terre par rapport aux teneurs initiales. (\*) Différences significatives ( $p < 0.05$ ) observées entre les différentes fractions densimétriques.



**Figure VI-7.** Rapports C/N obtenus pour le sol non fractionné (T0 et à T15) et pour les différentes fractions densimétriques pour les sols HOM et HOM<sub>+HAP</sub>. (a,b) Différences significatives ( $p < 0.05$ , test ANOVA 2) observées entre chacune des fractions densimétriques



### Répartition du carbone total ( $C_{total}$ ) et du carbone organique total (COT) dans le sol brut et les différentes fractions densimétriques.

Le carbone ( $C_{total}$  et COT) est distribué de façon hétérogène au sein des 5 fractions densimétriques comme le montre la **Figure VI-5**. La majorité du carbone organique est retrouvée dans la fraction <1.9 (MO non complexée) pour les deux conditions HOM et HOM<sub>+HAP</sub> avec 70 et 60% environ du carbone initial (mesuré pour le T15) respectivement. Concernant les fractions >1.9 (associations organo-minérales), le carbone total et le carbone organique diminuent avec l'augmentation de la densité. En effet, on retrouve 21% et 14% du carbone total dans la fraction 1.9-2.9 contre 3% et 2% dans la fraction >2.9 pour les conditions HOM et HOM<sub>+HAP</sub> respectivement. Le résultat est semblable concernant le carbone organique pour les deux conditions. Le pourcentage de carbone (total et organique) que représente chaque fraction par rapport aux teneurs en carbone initial est très variable d'une condition à l'autre, très prononcée pour la fraction >1.9 où les valeurs en COT ont été surestimées (>100%). Les tendances sont inversées par rapport au sol non fractionné puisque les valeurs en carbone semblent plus élevées pour la condition HOM. Cependant, aucune différence significative n'est observée entre les deux conditions que ce soit pour le sol non fractionné (à T0 et à T15) ou pour les différentes fractions (**Tableau VI-2**).

Une différence significative est observée entre la fraction <1.9 et les trois fractions denses 1.9-2.6, 2.6-2.9 et >2.9. Cependant, les concentrations mesurées pour ces trois dernières ne sont pas significativement différentes, même si les teneurs semblent plus élevées dans la fraction 1.9-2.6. Pour le carbone total, la perte estimée d'une condition à l'autre est très variable (données non présentées sur le graphique), en effet les pertes sont de  $0 \pm 26 \%$  pour HOM et de  $31 \pm 7 \%$  pour HOM<sub>+HAP</sub>. Concernant le COT, les pertes sont estimées à  $0 \pm 20 \%$  et à  $15 \pm 7 \%$  pour HOM et HOM<sub>+HAP</sub> respectivement. Mais les valeurs en COT étant surestimées, les pertes sont donc moindres par rapport au carbone total.

En regardant la différence visible sur le graphique entre le carbone total et organique, on constate que les fractions 1.9-2.6 et 2.6-2.9 sont celles qui présentent les teneurs en carbone inorganique les plus fortes. Ceci est à mettre en relation avec la présence de calcite dans ces fractions (**Figure VI-4**).

#### **Répartition de l'azote total dans le sol non fractionné (à T0 et à T15) et les fractions densimétriques.**

La distribution de l'azote est hétérogène au sein des différentes fractions et est présentée dans la **Figure VI-6**. Une forte hétérogénéité entre les répliqués est observée pour le sol non fractionné aux deux temps comme l'indiquent les écarts-types. Mais l'azote est retrouvé majoritairement dans la fraction <1.9 (les valeurs ont été surestimées par rapport aux teneurs dosées dans le sol non fractionné puisqu'on est à plus de 100%) puis les valeurs en N diminuent avec la densité. Pour les fractions >1.9 (associations organo-minérales), les teneurs les plus élevées sont retrouvées dans la fraction 1.9-2.6 avec environ 20% des teneurs initiales contre <5% pour la fraction 2.9 quelle que soit la condition. Aucune différence significative n'est observée entre les deux conditions que ce soit pour le sol non-fractionné et les fractions densimétriques. Par contre, les concentrations en azote sont significativement différentes entre la fraction <1.9 et les fractions les plus denses. Cependant, les fractions 1.9-2.6, 2.6-2.9 et >2.9 ne présentent pas de différences significatives entre elles malgré des tendances de teneurs plus élevées dans la fraction 1.9-2.6. Les pertes en azote sont de  $8,5 \pm 30 \%$  (très hétérogène) et de  $33 \pm 9 \%$  pour HOM et HOM<sub>+HAP</sub> respectivement (valeurs non présentées)

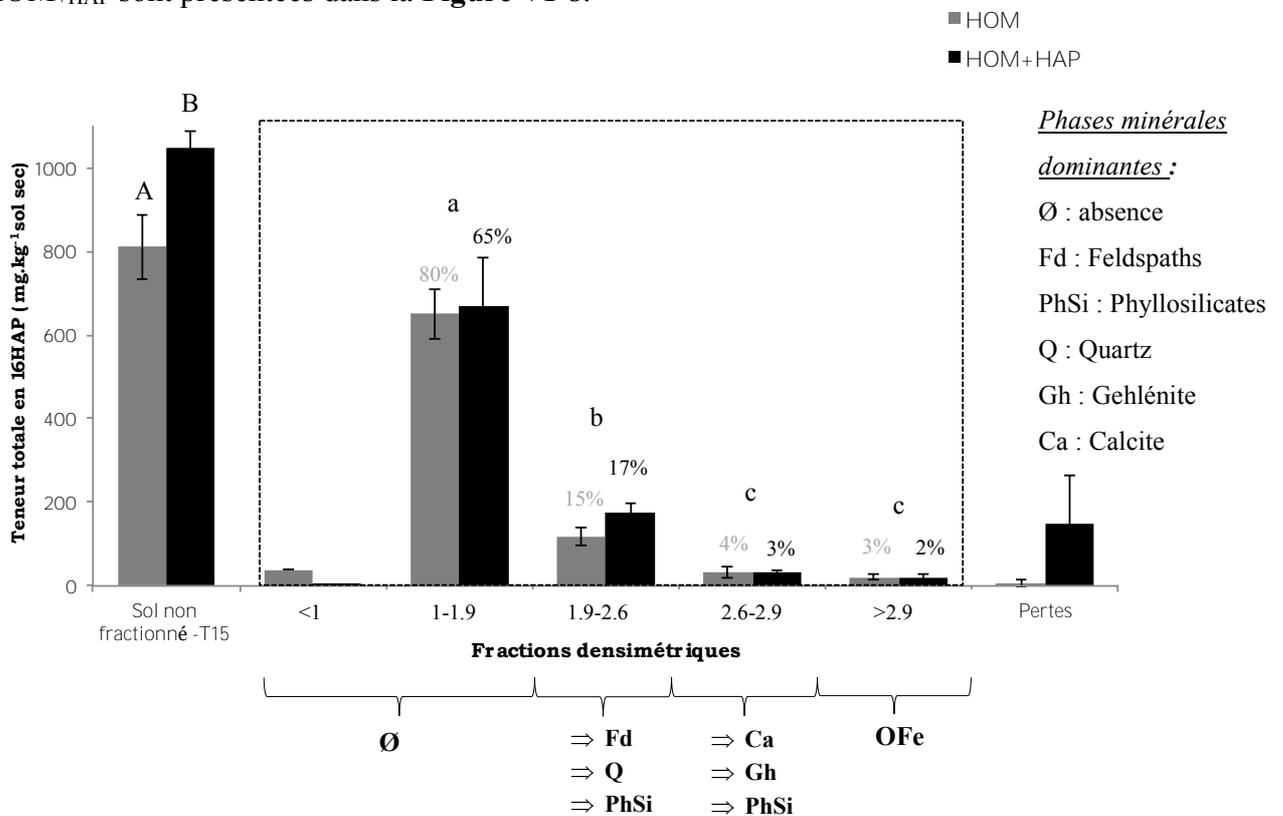
#### **Evolution du rapport C/N dans le sol non fractionné (T0 et T15) et dans les fractions densimétriques.**

Les rapports C/N calculés pour le sol non fractionné à T0 et à T15 et les différentes fractions densimétriques pour les deux conditions HOM et HOM<sub>+HAP</sub> sont présentés dans la **Figure VI-7**.

Pour le sol non fractionné, aucune différence significative (données non présentées) n'est observée entre les deux conditions HOM et HOM<sub>+HAP</sub> et entre les deux temps T0 et T15. Aussi, une hétérogénéité très élevée est visible surtout pour le sol HOM<sub>+HAP</sub>. Concernant les fractions densimétriques, les rapports C/N les plus élevés ont été retrouvés dans les fractions 1-1.9 et 1.9-2.6 alors que pour les fractions denses 2.6-2.9 et > 2.9 ils semblent plus faibles malgré les écarts importants. Cependant, les seules différences significatives sont observées entre la fraction 1.9 et la fraction 2.6-2.9 et entre les fractions 1.9-2.6 et 2.6-2.9. Les rapports C/N semblent très proches et ne sont pas significativement différents entre les fractions <1.9 et 1.9-2.6 et les fractions <1.9 et >2.9 en dépit de teneurs en azote et carbone significativement différentes (**Figure VI-5 et VI-6**). Une fraction se démarque des 3 autres, c'est la fraction 2.6-2.9 avec des rapports C/N plus faibles.

### 2.5. Répartition des 16 HAP dans le sol brut et les fractions densimétriques

Les teneurs en 16 HAP mesurées dans le sol non fractionné (à 15 jours, après la phase de stabilisation) et les différentes fractions densimétriques pour les deux sols HOM et HOM<sub>+HAP</sub> sont présentées dans la **Figure VI-8**.

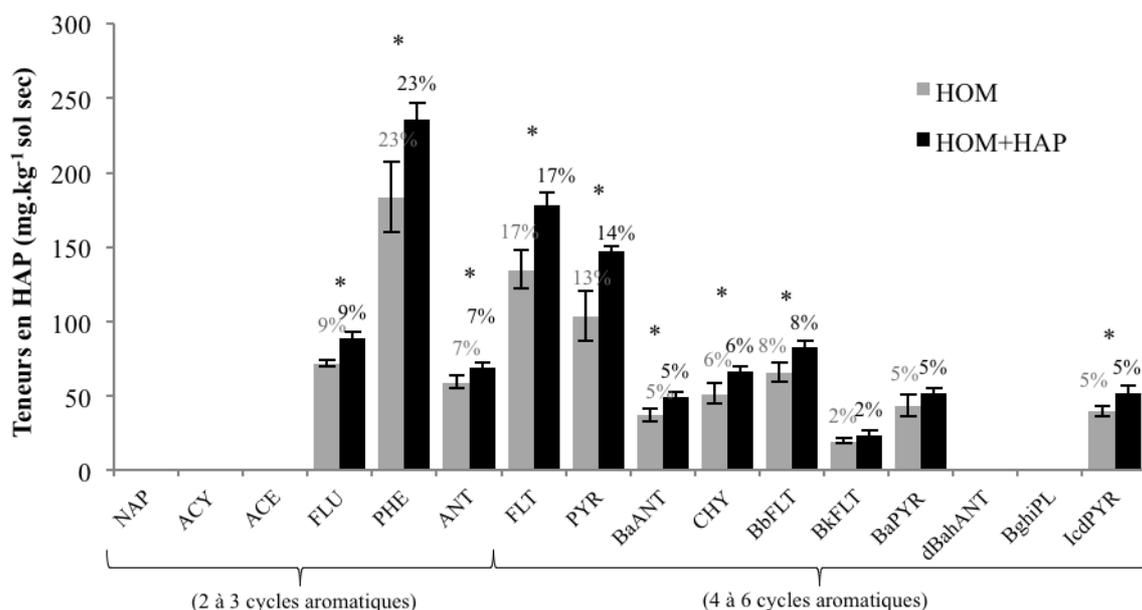


**Figure VI-8.** Teneurs totales en 16 HAP pour les sols non fractionnés HOM (gris) et HOM<sub>+HAP</sub> (noir) (après la phase de stabilisation) et pour les différentes fractions densimétriques avec pour chacune les phases minérales associées identifiées par

DRX. Deux lettres différentes indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ , test ANOVA2) (Majuscules) entre les sols non fractionnés (T15) (minuscules) entre les différentes fractions. (%) indique la proportion que représente chaque fraction par rapport à la teneur totale en 16HAP initiale.

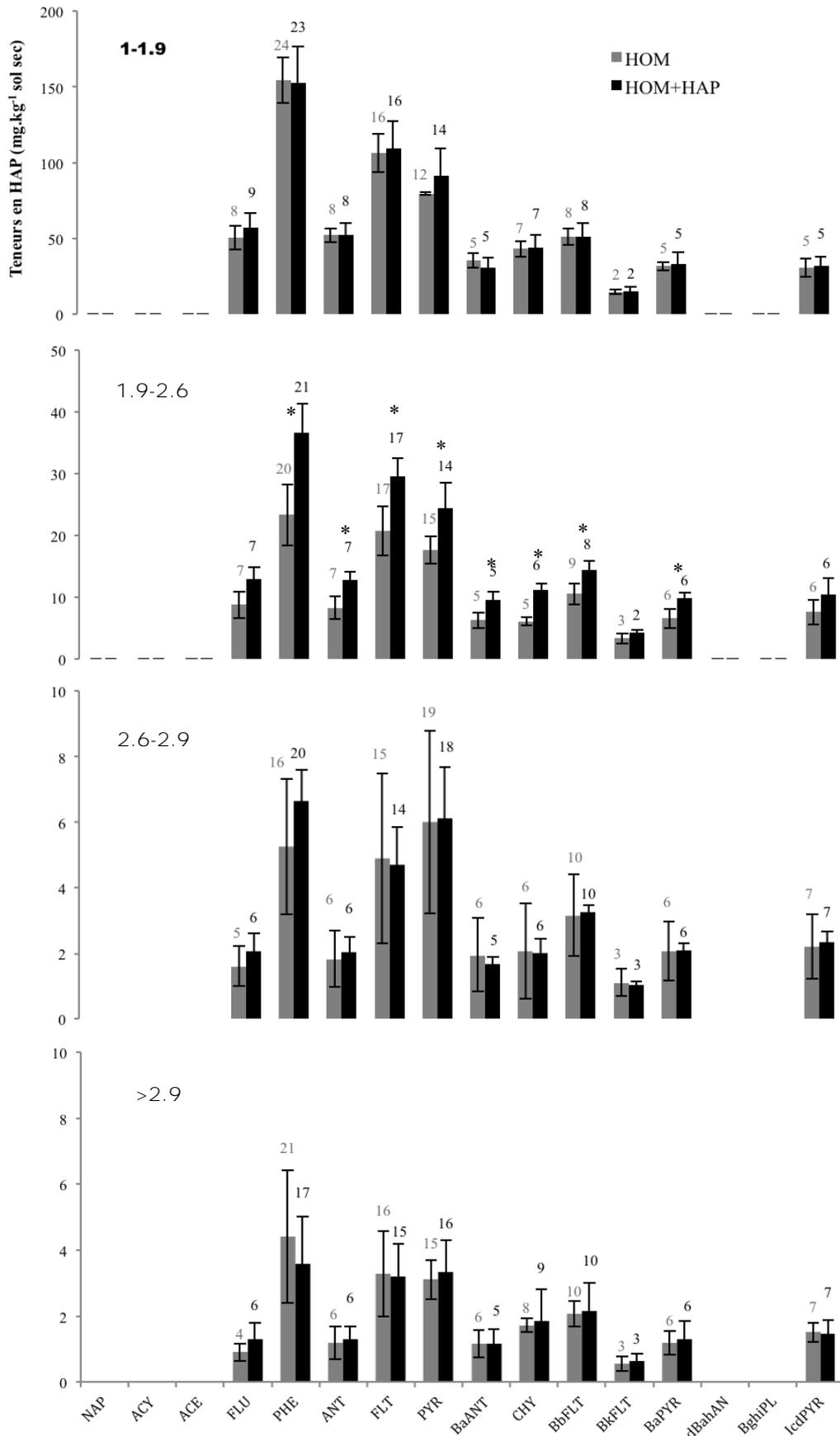
Les teneurs en 16 HAP dans le sol non fractionné ne sont pas significativement différentes avant la phase de stabilisation (T0) (données non présentées ici) et après (T15) pour chaque sol. Les teneurs en 16 HAP sont données à T15 et montrent une différence significative (A, B) entre les sols HOM et HOM<sub>+HAP</sub>. La différence en HAP observée correspond à la recontamination qui est de  $239 \pm 47 \text{ mg.kg}^{-1}$

Cependant aucune différence significative n'est observée entre ces deux modalités si l'on considère chacune des fractions. Les pertes dues au fractionnement par densimétrie sont non négligeables mais restent relativement faibles pour la condition HOM et sont très hétérogènes pour HOM<sub>+HAP</sub> comme le montre l'écart-type. Pour le sol HOM<sub>+HAP</sub>, de manière générale l'hétérogénéité des valeurs est plus marquée que pour HOM. Si l'on s'intéresse à la distribution des teneurs totales en HAP mesurées dans les différentes fractions densimétriques, les concentrations sont significativement différentes entre les fractions excepté entre les fractions 2.6-2.9 et  $d > 2.9$ . La répartition des 16 HAP au sein des fractions de densité est hétérogène. La majorité des HAP est retrouvée dans la fraction 1-1.9 suivie par la fraction 1.9-2.6 et la concentration diminue avec l'augmentation de la densité. En effet, les teneurs passent de 600 à 20  $\text{mg.kg}^{-1}$  environ de la fraction 1-1.9 à la fraction  $> 2.9$  avec une concentration intermédiaire d'environ 150  $\text{mg.kg}^{-1}$  dans la fraction 1.9-2.6. Pour chaque fraction, les phases minérales dominantes sont rappelées (légende sous la figure). Pour les conditions HOM et HOM<sub>+HAP</sub> respectivement, 80 et 65% des HAP sont retrouvés dans la fraction MO libre (1-1.9). Environ 20% des teneurs totales sont présentes au sein des MO associées principalement au quartz, feldspaths et phyllosilicates (1.9-2.6) et moins de 5% dans la fraction où dominant la calcite et les phyllosilicates (2.6-2.9) et la fraction MO associée aux oxydes de fer ( $> 2.9$ ).



**Figure VI-9.** Répartition des HAP dans les sols non fractionnés HOM (gris) et HOM<sub>+HAP</sub> (noir) après la phase de stabilisation (T15). La valeur placée au-dessus de chaque barre donne la proportion relative (%) de chacun des HAP dans les sols. Les différences significatives ( $p < 0,05$ ) observées entre les sols sont annotées par (\*). (NAP : naphthalène, ACY : acénaphtylène, ACE : acénaphène, FLU : fluorène, PHE : phénanthrène, ANT : anthracène, FLT : fluoranthène, PYR : pyrène, BaANT : benzo(a)anthracène, CHY : chrysène, BbFLT : benzo(b)fluoranthène, BkFLT : benzo(k)fluoranthène, BaPYR : benzo(a)pyrène, dBahAN : dibenzo[ah]anthracène, BghiPL : benzo[ghi]pérylène, IcdPYR : Indéno[1,2,3-cd]pyrène)

La distribution des HAP dans les sols non fractionnés HOM et HOM<sub>+HAP</sub> et l'abondance relative de chacun (%) est présentée dans la **Figure VI-9**. Les HAP les plus abondants dans le sol sont le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène représentant en moyenne 23%, 17%, 14% de la teneur en HAP totale du sol respectivement. Les proportions relatives de chaque HAP sont similaires dans le sol enrichi HOM<sub>+HAP</sub>. Cependant, les teneurs sont significativement (\*) plus élevées pour la majorité des HAP dans le sol HOM<sub>+HAP</sub> à l'exception du benzo[k]fluoranthène et du benzo[a]pyrène. Toutefois, 5 HAP parmi les 16 n'ont pas été détectés ici : c'est le cas pour les 3 plus légers (naphthalène, acénaphtylène et acénaphène) qui sont probablement absents étant donné leur volatilité élevée, et pour deux HAP lourds (dibenzo[ah]anthracène et benzo[ghi]pérylène). On constate que les HAP de faible poids moléculaire (2 à 3 cycles benzéniques) représentent 39% des HAP totaux contre 61% pour les HAP de poids moléculaire élevé (4 à 6 cycles).



**Figure VI-10.** Répartition des 16 HAP au sein de chaque fraction densimétrique des sols HOM et HOM+HAP. La proportion relative (%) de chacun des 16 HAP dans les différentes fractions est donnée par le chiffre présent au-dessus de chaque barre d'histogramme. Les différences significatives ( $p \leq 0,05$ ) entre les deux sols/terres sont indiquées par \*

La distribution des HAP au sein de la fraction MO libre (1-1.9) et des fractions MO associée aux minéraux (1.9-2.6 ; 2.6-2.9 et  $d > 2.9$ ) est présentée dans la **Figure VI-10**.

La répartition des HAP est hétérogène dans chaque fraction, les HAP retrouvés majoritairement (entre 15 et 20% de la teneur totale en HAP en moyenne) dans chacun des cas sont : le phénanthrène (PHE), le pyrène (PYR) et le fluoranthène (FLT) pour HOM et HOM<sub>+HAP</sub>. Par contre cinq des 16 HAP représentés sont absents sur chaque histogramme : c'est le cas pour les 3 plus légers : le naphthalène (NAP), l'acénaphthylène (ACY) et l'acénaphthène (ACE). De même, deux HAP lourds ne sont pas retrouvés : le dibenzo(ah)anthracène (dBahA) et le benzo(ghi)pérylène (BghiPL). La même observation a été faite (**Figure VI-9**) pour le sol non fractionné. La fraction 1-1.9 est celle dans laquelle la majorité des HAP est retrouvée, entre 60 et 80% des HAP totaux en moyenne pour HOM et HOM<sub>+HAP</sub> (**Figure VI-8**). Aucune différence significative n'est observée dans cette fraction entre les deux conditions HOM et HOM<sub>+HAP</sub>. La fraction 1.9-2.6 représente environ 15% des HAP dosés dans les sols HOM et HOM<sub>+HAP</sub>. Contrairement à la fraction précédente, des différences significatives sont observées entre les 2 sols pour la plupart des HAP excepté pour le fluorène, le benzo[k]fluoranthène et l'indéno [1,2,3-cd]pyrène. Les fractions 2.6-2.9 et  $d > 2.9$  sont les moins riches en HAP avec environ 4% des HAP totaux. Comme pour les concentrations en éléments (C, N) dans les sols (**Figure VI-5 et VI-6**) les teneurs en HAP sont plus faibles lorsque la densité des particules augmente. Les HAP majoritaires et absents de la distribution sont toujours les mêmes que précédemment et aucune différence significative n'est observée entre les deux sols HOM et HOM<sub>+HAP</sub>.

En regroupant les HAP de bas poids moléculaires et de haut poids moléculaires, on observe une diminution de l'ensemble des HAP de bas poids moléculaires avec l'augmentation de la densité alors qu'au contraire la somme des HAP de haut poids moléculaire augmente de la fraction la plus légère (1-1.9) à la plus dense ( $> 2.9$ ). En effet, 40% des HAP de bas poids moléculaire contre 60% pour les HAP de haut poids moléculaire sont retrouvés dans la fraction 1-1.9. Une diminution est observée dans les fractions intermédiaires 1.9-2.6 et 2.6-2.9 avec 34% et 27% respectivement pour les bas poids moléculaires et une augmentation pour les hauts poids moléculaire avec 66 et 73% des HAP totaux respectivement.

### 3. Discussion

#### 3.1. Pertes de matières dues au fractionnement densimétrique

Durant le processus de séparation densimétrique, une quantité non négligeable de matière a été perdue (5% en masse) et constitue des pertes importantes en éléments ( $C_{\text{total}}$ , COT, N) surtout pour le sol  $\text{HOM}_{+\text{HAP}}$  (en moyenne 30%, 15% et 33% de pertes respectivement pour ce sol). Aussi, les résultats présentés dans la **Figure VI-8** montrent des pertes importantes en HAP (environ 15% des HAP totaux) pour  $\text{HOM}_{+\text{HAP}}$ . Ces pertes conséquentes peuvent être expliquées par l'apport d'un extrait organique dans le sol  $\text{HOM}_{+\text{HAP}}$  qui rend les composés organiques ajoutés plus disponibles et donc plus facilement mobilisables lors du mélange sol et solution de polytungstate de sodium (SPT). Au cours du fractionnement, le SPT jaune au départ prend une couleur brunâtre c'est également ce qu'a observé de Junet (2008). En effet, d'après les travaux de Crow et al. (2007) et de Junet (2008) une partie des composés organiques présents dans le sol ont pu être solubilisés lors de la dispersion avec le SPT. Ils observent des pertes similaires en termes de carbone et d'azote (20% en moyenne) mais qui dépendent de plusieurs paramètres dont la structure du sol et la minéralogie (Crow et al., 2007). L'étape de sonication peut aussi grandement expliquer les pertes de C, d'N et de HAP observées au cours de cette expérimentation. En effet, elle peut entraîner une redistribution des composés organiques dans les fractions comme certains auteurs l'ont observé Chenu and Plante (2006) et Kaiser and Guggenberger (2003) pour le carbone mais aussi des particules minérales dans les différentes fractions physiques (Amelung and Zech, 1999). Cependant, la sonication représente une étape déterminante pour une séparation efficace de la MO libre et des MO liées aux minéraux (Christensen, 1992). Mais Schmidt et al. (1999) n'ont pas observé de détachement et de redistribution de MO entre les fractions en appliquant une énergie de dispersion comprise entre 30 et 590 J/mL (au cours des séparations l'énergie de dispersion que nous avons appliqué est comprise dans une gamme de 30-150 J/mL).

### 3.2. Caractérisation des associations organo-minérales

#### 3.2.1. MO non liée aux minéraux

L'analyse minéralogique de la fraction 1-1.9 a montré l'absence de phases minérales cristallisées ce qui suggère bien la présence de MO non associée aux minéraux. Elle présente les teneurs en  $C_{total}$ , COT et N les plus élevées confirmant la part majeure de la MO dans cette fraction. Le rapport C/N est élevé ce qui laisse supposer la présence de MO fraîche mais étant dans un sol historiquement contaminé le rapport peut aussi s'expliquer par la présence de matière organique d'origine anthropique (Pernot, 2013). D'après Biache et al. (2013) la MO naturelle représente moins de 1% des constituants solides présents dans ce sol contre plus de 20% de MO anthropiques (charbon, coke, etc.). Ceci peut également expliquer la faible surface spécifique retrouvée pour la MO libre, les MO anthropiques étant moins réactives que les MO naturelles.

#### 3.2.2. MO associées aux différentes phases minérales du sol

Les fractions de densités supérieures constituées par les associations organo-minérales 1.9-2.6 ; 2.6-2.9 et >2.9 possèdent des phases minérales variables d'une fraction à l'autre. La MO présente dans la fraction 1.9-2.6 est majoritairement associée aux feldspaths avec la microcline et l'albite, aux phyllosilicates avec la montmorillonite (smectite), la muscovite (mica) et au quartz minéral très bien cristallisé donc facilement observable. Les minéraux majoritaires associés à la MO de la fraction 2.6-2.9 sont la calcite, la gehlénite, aux phyllosilicates (muscovite). La fraction la plus dense >2.9  $g.cm^{-3}$  contient majoritairement des oxydes et hydroxydes de fer (ex. goethite, hématite, magnétite).

Les rapports C/N (**Figure VI-7**) ont montré des valeurs non significativement différentes entre les fractions densimétriques à l'exception de la 2.6-2.9 qui présente un rapport moins élevé et significativement différent de la MO libre (1-1.9) et de la MO majoritairement complexée aux feldspaths, phyllosilicates et quartz (1.9-2.6). La composition relative en C/N des fractions 1-1.9 et 1.9-2.6 et celles des fractions 2.6-2.9 et 2.9 semblent proches et pouvant suggérer des origines communes. La diminution du rapport dans les fractions les plus denses peut être expliquée, au moins partiellement, par la sorption et la stabilisation de composés azotés à la surface des minéraux (Sollins et al., 2006). Ces composés azotés peuvent être de différentes natures. Ils peuvent correspondre à des protéines

(Knicker, 2007, 2000; Schnitzer and Schulten, 1995) mais aussi à des hétérocycles azotés mais en proportion moins importante (Mertz et al., 2005; Smernik and Baldock, 2005). Pernot et al. (2013) ont observé un rapport C/N plus faible dans la fraction limoneuse fine, par rapport aux autres fractions granulométriques caractérisées, lié à la présence de CAP azotés (N-hétérocycles) caractérisant le goudron de houille en accord avec les résultats de (Haeseler et al., 1999)

Concernant les surfaces spécifiques (**Tableau VI-1**), la valeur la plus élevée est retrouvée pour la MO majoritairement associée aux oxydes et hydroxydes de fer (>2.9), minéraux particulièrement réactifs dans les sols (Guggenberger and Kaiser, 2003). Ensuite, pour la MO principalement liée au quartz, aux feldspaths et aux phyllosilicates dont une smectite (la montmorillonite). Ces derniers peuvent jouer un rôle important dans les processus de séquestration de la MO (Kennedy et al., 2002; Theng et al., 1986) due à leur grande surface spécifique. La sorption des matières organiques du sol aux argiles et aux oxydes fait partie des mécanismes essentiels pour la préservation à long terme du carbone organique des sols (Lehmann et al., 2007; Lützow et al., 2006). Toutefois, la sorption de la MO réduit la surface spécifique des constituants minéraux du sol (Kaiser and Guggenberger, 2003). La fraction >2.9 étant faiblement concentrée en C et N, ceci peut expliquer sa surface élevée avec des sites réactifs encore accessibles et la valeur plus basse observée pour la fraction 1.9-2.6, la deuxième plus concentrée en C et N. Les teneurs en  $C_{total}$ , COT et N les plus élevées ont été retrouvées à chaque fois pour la MO majoritairement associée aux feldspaths, phyllosilicates et quartz (1.9-2.6). Pour les deux fractions les plus denses (2.6-2.9 et >2.9) les concentrations en  $C_{total}$ , COT et N les plus faibles ont été observées et ne diffèrent pas significativement d'une fraction à l'autre.

Le fractionnement par densimétrie appliqué sur les sols HOM et HOM<sub>+HAP</sub> semble avoir permis une bonne séparation des associations organo-minérales qui sont facilement reconnaissables de par leurs caractéristiques propres.

### 3.3. . Distribution des HAP dans la MO libre et complexée aux minéraux

Dans les sols non fractionnés HOM et HOM<sub>+HAP</sub>, une différence significative a été mise en évidence à T0 et à T15 avec des teneurs plus élevées pour HOM<sub>+HAP</sub> que pour HOM dû à

l'ajout de l'extrait organique. Ceci confirme que l'apport en HAP a bien été réalisé et que de ce fait le sol HOM<sub>+HAP</sub> présente une contamination plus disponible.

Pour le sol non fractionné HOM aucune différence significative n'a été observée entre les deux temps c'est-à-dire avant (T0) et après (T15) la phase de stabilisation, le constat est le même pour le sol HOM<sub>+HAP</sub> indiquant l'absence de pertes au cours de la stabilisation.

Dans les fractions densimétriques, en moyenne 80% des HAP ont été retrouvés dans la MO non associée aux minéraux ce qui indique que la majorité des HAP ne sont pas liés ou faiblement liés aux phases minérales. Ahn et al. (2005) ont aussi montré que la majorité des HAP (entre 66 et 78% des HAP totaux) étaient retrouvés associés avec la matière particulaire carbonée de faible densité. Plusieurs études ont montré l'impact de la MO sur la dynamique des HAP (Salloum et al., 2002; Simpson et al., 2003; Wang and Xing, 2005).

La fraction 1.9-2.6 est la 2<sup>ème</sup> plus riche en HAP avec environ 15% de la teneur initiale retrouvée dans laquelle la MO est principalement liée avec les feldspaths (microcline et albite), le quartz et les phyllosilicates (kaolinite, muscovite et smectite).

Les fractions les plus denses 2.6-2.9 et >2.9 sont celles où les HAP sont les moins concentrés, malgré tout, ces associations organo-minérales assureraient un rôle de protection vis-à-vis des polluants organiques. En effet, l'un des principaux mécanismes expliquant la préservation des MO dans les sols serait la stabilisation par interactions avec les phases minérales dont les oxydes et les phyllosilicates (Lutzow et al. 2006). Dans ces deux fractions, les minéraux sont majoritaires avec des argiles associées aux deux types de MO et des oxydes de fer dans la fraction >2.9. La plupart des minéraux ont des propriétés de sorption élevées vis-à-vis des HAP (Hwang et al., 2002; Karimi-lotfabad and Samples, 1996; Lahlou and Ortega-Calvo, 1999) et contribuent à la stabilisation de la MO (incluant les HAP) dans les sols contaminés (Biache et al., 2014; Ghislain et al., 2010). Les MO principalement associées à la calcite, gehlénite et aux phyllosilicates (2.6-2.9) de HOM et HOM<sub>+HAP</sub> ont été caractérisées par des surfaces spécifiques plus faibles et proches de la valeur mesurée pour la MO libre. Cependant, dans cette fraction les teneurs en HAP retrouvées sont très faibles (moins de 5% des teneurs en HAP totales) ce qui suggère peu d'interactions entre les associations organo-minérales de la fraction 2.6-2.9 et les contaminants organiques. Cette fraction est dominée par des minéraux moins réactifs comme la calcite et la gehlénite (Ca<sub>2</sub>Al<sub>2</sub>SiO<sub>7</sub>). Mader et al. (1997) ; Stauffer and Macintyre (1986) ; Weber et al. (1998) ont montré une affinité moins élevée de contaminants organiques hydrophobes par rapport à certains minéraux comme des oxydes d'aluminium ou de silicates. Quant à la MO

principalement associée aux oxyhydroxydes de fer (>2.9), les valeurs de surfaces spécifiques retrouvées sont les plus élevées ce qui laisse supposer la présence de nombreux sites réactifs. En effet, si l'on fait le parallèle avec les teneurs en HAP on constate que <5% des HAP totaux sont retrouvés. Les oxydes de fer sont connus pour être réactifs cependant une grande majorité des composés présents dans ce sol historiquement contaminés sont hydrophobes. Les surfaces polaires exposées par les oxydes sont peut-être moins adaptées pour interagir avec ce type de composés hydrophobes. Monserie et al. (2009) ont montré que la fraction limoneuse fine présentait des phases minérales réactives avec les argiles et les oxydes de fer qui peuvent être impliqués dans des mécanismes de préservation. Ou bien les oxydes seraient moins accessibles par formation à l'intérieur des agrégats, donnant lieu à des contacts faibles avec l'extérieur et des interactions peu élevées entre les surfaces des oxydes des fer et les HAP.

Les HAP sont distribués de manière non aléatoire dans le sol non fractionné et dans les fractions densimétriques. Pour chaque distribution les HAP dominants sont les mêmes, de même pour ceux que l'on n'observe pas. Pernot et al. (2013) ont également montré une distribution des HAP similaire entre chaque fraction granulo-densimétrique avec une prédominance des composés de 3 à 4 cycles benzéniques. Cependant, en comparant chacune des fractions densimétriques nous avons pu observer, pour les deux sols HOM<sub>+HAP</sub> et HOM, une diminution des HAP de bas poids moléculaires (2 à 3 cycles) et une augmentation des lourds (4 à 6 cycles) avec l'augmentation de la densité des particules. Les HAP de haut poids moléculaire sont plus récalcitrants chimiquement et avec le temps ils auraient tendance à se fixer aux minéraux, induisant des processus de protection physico-chimiques. Les oxydes métalliques et les argiles font parties des phases minérales qui ont tendance à stabiliser les MO par interactions dans les sols. Ceci suggérerait que les fractions les plus denses auraient tendance à préserver les contaminants, et par conséquent les HAP les plus récalcitrants et donc les plus lourds. Les travaux de Pernot et al. (2013) et Amellal et al. (2001) ont montré des résultats similaires mais prenant en compte la taille des particules et non la minéralogie. Cependant, Pernot et al. (2013) ont mis en avant le rôle protecteur de la fraction fine limoneuse dans laquelle des argiles minéralogiques et des oxydes de fer peuvent être retrouvés. Ceci suggère de fortes interactions entre ces composés et les constituants minéraux du sol (Amellal et al., 2001b).

### 3.4. . Localisation des HAP issus de la contamination fraîche

Les teneurs en HAP totaux ne sont pas significativement différentes entre les deux sols HOM et HOM<sub>+HAP</sub> (**Figure VI-9**). Toutefois, si l'on regarde les teneurs de chacun des 16 HAP au sein de cette fraction (**Figure VI-10**), une différence significative est observée entre HOM et HOM<sub>+HAP</sub> pour la majorité des 16 HAP montrant une association préférentielle des HAP fraîchement apportés avec les MO majoritairement associées aux feldspaths, aux phyllosilicates et au quartz. Dans cette fraction, la MO interagit avec des phases minérales pouvant influencer grandement sur le comportement des contaminants comme les phyllosilicates et notamment la montmorillonite. En effet, les smectites possèdent une surface spécifique élevée ce qui leur confèrent une forte capacité d'adsorption, des contaminants notamment Biswas et al. (2015). Aussi, la surface spécifique retrouvée pour la fraction 1.9-2.6 semble plus élevée dans le sol HOM que dans HOM<sub>+HAP</sub> ce qui laisse supposer la présence de davantage de sites réactifs de surface dans le premier. Ceci peut être expliqué par l'ajout de composés organiques hydrophobes dans le sol HOM<sub>+HAP</sub> entraînant la diminution des sites de surfaces disponibles.

Les différences significatives sont observées entre HOM et HOM<sub>+HAP</sub> pour la plupart des HAP à l'exception du fluorène, du benzo[k]fluoranthène et de l'indéno[1,2,3-cd]pyrène. En comparant la distribution des HAP dans le sol global (**Figure VI-8**), une différence significative est mise en évidence entre HOM et HOM<sub>+HAP</sub> pour le fluorène. En effet, le fluorène est un HAP léger (3 cycles) qui présente une solubilité significative ( $1,9 \text{ mg.L}^{-1}$ ) par rapport à d'autres HAP présents, le rendant plus mobilisable. Une différence significative est observée entre les deux sols pour le benzo(a)pyrène (BaPY) dans la fraction 1.9-2.6 mais n'est pas identifiée dans le sol global.

## 4. Conclusion

L'analyse granulométrique repose uniquement sur des critères géométriques, et ne considère pas les caractéristiques chimiques et minéralogiques (Amellal et al., 2001b; Pernot et al., 2013). Dans cette étude, nous avons cherché à étudier l'impact des minéraux sur la répartition des HAP. Les HAP ne sont pas distribués de manière aléatoire au sein des différentes associations organo-minérales. Les résultats obtenus pour cette étude ont montré l'importance des MO libres dans la dynamique des HAP. En effet, la majorité des HAP sont

retrouvés associés à la fraction légère, MO non liée aux minéraux, pour le sol vieilli (HOM) et rajeuni (HOM<sub>+HAP</sub>). Cependant, les HAP fraîchement ajoutés au sol HOM ont été concentrés dans la fraction MO principalement associée au quartz, aux feldspaths et aux phyllosilicates.

La procédure de séparation densimétrique a engendré des pertes importantes surtout pour les sols qui ont été artificiellement contaminés ce qui n'est pas surprenant étant donné que les polluants fraîchement ajoutés sont plus disponibles et moins liés aux particules du sol contrairement aux contaminants déjà présents. Toutefois, cette méthode a permis d'axer l'étude de la distribution des HAP dans les sols en fonction de la minéralogie des associations organo-minérales produites.

Une analyse en thermodésorption pourrait s'avérer intéressante afin de préciser la biodisponibilité des HAP en fonction de leur localisation au sein des différentes fractions densimétriques (Biache et al., 2015). Elle permettrait d'appuyer le rôle protecteur d'une fraction par rapport à une autre. La nature et la composition de la MO étant des paramètres importants dans la capacité de sorption des contaminants (Pan et al., 2006; Yang et al., 2010), il serait intéressant d'identifier la nature des phases organiques en plus des minéraux dans chacune des fractions de sol à l'aide de méthodes analytiques telles que la pyGCMS et la RMN par exemple.

## **Chapitre VII. Discussion générale et perspectives**



Pour l'évaluation des risques et la gestion des sols pollués, comprendre l'évolution des contaminants est fondamentale. Les HAP font partie des polluants majoritairement retrouvés dans les sols de friches industrielles. A l'heure actuelle, il est reconnu que de nombreux processus biotiques et/ou abiotiques peuvent régir leur devenir et leur nature dans les sols. Néanmoins, il existe encore de nombreux verrous à lever sur ces processus, qui conditionnent leur disponibilité. L'objectif général de la thèse a donc été de préciser la dynamique des HAP dans des sols plantés ou non plantés en se focalisant sur leur distribution et leur localisation dans les compartiments du sol et de la rhizosphère à différentes échelles spatiales, « globale » et micrométrique, et sur la nature des produits issus de leur transformation. Différentes approches ont été utilisées en vue d'élucider le devenir des HAP avec une complexité croissante de la pollution : à partir (i) d'un sol forestier planté et contaminé artificiellement avec du  $^{13}\text{C}$ -PHE et (ii) d'un sol historiquement contaminé de façon à se rapprocher des conditions réelles. Une des originalités de cette étude est l'utilisation de l'outil NanoSIMS permettant de localiser le polluant marqué à une échelle très fine, ainsi que l'utilisation d'une méthode de fractionnement par densimétrie pour suivre la rétention des HAP au sein de différentes fractions organiques et organo-minérales. A notre connaissance, ces techniques ont peu ou pas été utilisées dans l'étude de la dynamique des HAP dans les sols.

## **1. Devenir du PHE et des produits issus de sa transformation dans le sol et dans la rhizosphère**

De nombreuses investigations menées ces dernières années ont montré la présence (Aprill & Sims, 1990; Joner & Leyval 2003; Binet et al. 2001) mais aussi l'absence (Fang et al., 2001; Günther et al., 1996; Rezek et al., 2008) d'effet des plantes sur la dissipation des HAP. Les plantes pouvant de ce fait jouer un rôle essentiel dans la dynamique des HAP, ont été intégrées à l'étude. En continuité avec les études menées au laboratoire jusqu'à présent et après une étude préliminaire, c'est le ray-grass qui a été choisi.

La majorité du PHE ajouté au sol a été dissipé à la fin de l'essai ( $\approx 90\%$ ), le constat a été le même en présence ou en absence de ray-grass. L'effet potentiel de la plante, et indirectement de la rhizosphère, sur la dissipation des HAP n'est pas visible ici. L'absence d'effet de la rhizosphère sur la dégradation des HAP peut être expliqué par les conditions expérimentales. Il a déjà été démontré que l'apport d'une contamination artificielle, et

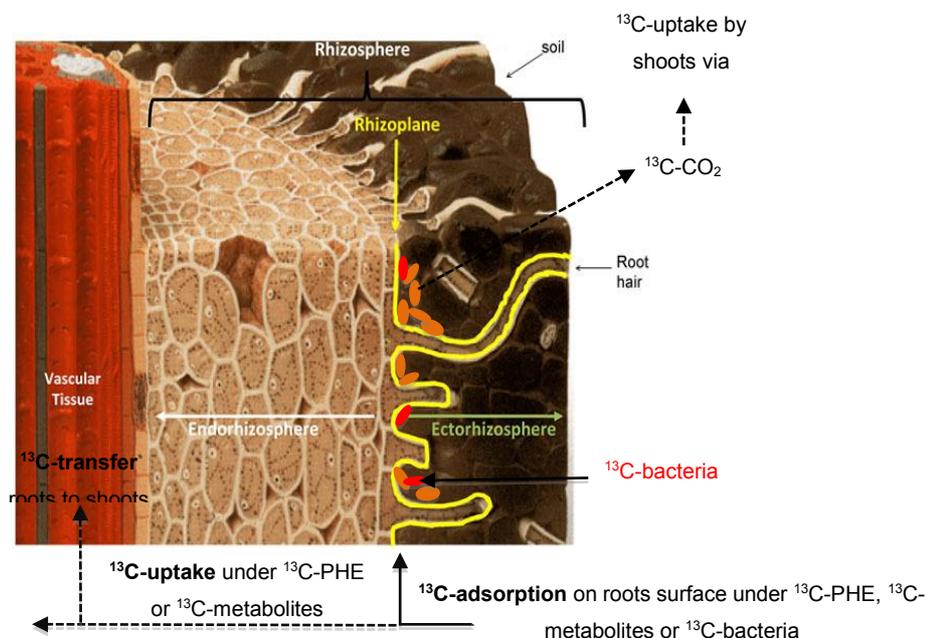
particulièrement avec un HAP léger, et d'une microflore adaptée occasionne une dissipation rapide des HAP (Cerniglia, 1993; Joner et al., 2004; Smith et al., 2011). L'objectif, ici, était qu'une part significative du polluant ajouté soit biotransformée ou séquestrée, pour étudier le compartiment non extractible. Pour cela, et d'après les travaux de Louvel (2010) et Bourceret (2016), le sol a été contaminé artificiellement ce qui signifie que la pollution est entièrement disponible au temps initial (T0). De plus, le sol a été inoculé par une microflore extraite à partir d'un sol industriel, et donc adaptée à la contamination. Pour mettre en évidence l'effet de la rhizosphère, il aurait sans doute fallu ajouter une source de HAP moins disponible mais en prenant le risque d'observer une dégradation lente de celui-ci, ou d'observer la biodégradation après un temps de contact plus court avec les racines.

### 1.1. Localisation du C issu du PHE dans les microorganismes de la rhizosphère

Un enrichissement global de la plante en  $^{13}\text{C}$  a été mis en évidence dans les racines et les parties aériennes à partir de 7 jours et a été maintenu au cours du temps. Il a aussi été observé dans les racines après 14 jours par les analyses en NanoSIMS. Pourtant, la concentration en  $^{13}\text{C}$  dans le « compartiment végétal » représente une faible proportion (<1%) par rapport à la quantité de  $^{13}\text{C}$ -PHE initialement ajoutée dans le sol. Une partie du  $^{13}\text{C}$  a pu se retrouver adsorbée à la surface des racines via les particules de sol ou des microorganismes adhérents aux racines. En effet, les racines analysées (exception faite pour les racines « NanoSIMS ») ont été rincées à l'eau, mais des particules de sol et des microorganismes ont pu rester accrochés aux racines. Une partie du  $^{13}\text{C}$  pourrait être absorbée dans les tissus racinaires mais selon les travaux de Binet et al. (2000b), l'absorption des composés de faible poids moléculaire par les racines est limitée, et même plus faible que l'adsorption.

Dupuy et al. (2016) ont montré que du PHE était localisé dans l'exoderme et l'endoderme des racines de maïs de même que Wild et al. (2005). Toutefois, dans notre étude le phénanthrène marqué au  $^{13}\text{C}$  n'a pas été identifié dans ce compartiment racinaire. Les composés adsorbés sur les racines ou sur les particules de sol adhérentes aux racines peuvent être des produits de transformation plus réactifs que le polluant parent. Mais le C issu du PHE a pu aussi, compte tenu de l'activité microbienne intense, être utilisé comme source de C pour la biosynthèse de constituants cellulaires, et ainsi pu se retrouver incorporé dans la biomasse microbienne.

En raison de la faible solubilité des HAP, les transferts des racines vers les parties aériennes semblent limités (Binet et al., 2000b; Burken and Schnoor, 1998), l'enrichissement observé dans les racines n'est probablement pas dû à des transferts longitudinaux (racines → parties aériennes) mais plus probablement à l'incorporation (par photosynthèse) du  $^{13}\text{C}$  minéralisé ( $^{13}\text{C}\text{-CO}_2$ ).



**Figure VII-1.** Schéma d'une section de racine représentant la structure de la rhizosphère, et le devenir probable du  $^{13}\text{C}$ -PHE dans la rhizosphère (adapté de McNear, (2013))

La rhizosphère des plantes est un environnement très complexe gouverné par une multitude de processus impliquant les racines, le sol et les bactéries (**Figure VII-1**). La complexité des interactions ayant lieu entre ces différentes composantes requiert des techniques permettant d'élucider les processus à des échelles très fines, centimétriques (Bourceret et al., 2015) voir micrométriques (Oburger and Schmidt, 2015) pour préciser le devenir des HAP en présence de plantes (**Figure VII-1**). Plus l'échelle d'observation est fine et plus l'hétérogénéité du milieu va se révéler, néanmoins les informations fournies seront de plus en plus précises.

Le couplage entre l'expérimentation isotopique et l'outil de NanoSIMS a permis de localiser une partie du  $^{13}\text{C}$  mais uniquement aux alentours des racines pour lesquelles le sol adhérent a été conservé. Les résultats de NanoSIMS ont suggéré qu'une partie du  $^{13}\text{C}$  a été assimilée par les bactéries de la rhizosphère mettant en avant leur rôle dans la dynamique des HAP. Une extraction de la biomasse bactérienne par la méthode Nycodenz aurait pu permettre

de compléter et d'appuyer ces résultats, par exemple en montrant une concentration élevée en  $^{13}\text{C}$  dans les cellules bactériennes.

## 1.2. Répartition du PHE et des composés issus de sa transformation dans le sol.

Une partie considérable du C issu du PHE est retrouvée séquestrée au sol sous forme de résidus liés non extractibles, cette fraction atteint rapidement  $\pm 40\%$  après 14 jours pour se stabiliser ensuite comme l'ont précédemment souligné Cébron et al. (2011) avec environ 30% du  $^{13}\text{C}$  ajouté retrouvé piégé dans le sol. Parallèlement, la quantité de C issu du PHE extractible diminue au cours du temps et n'est plus que de 10% après 21 jours par rapport à la quantité initiale. En effet, le C-PHE est entièrement biodisponible dans le sol en début d'expérimentation (T0) et est rapidement biodégradé par la microflore active, les 14 premiers jours, et simultanément les composés issus de la transformation du PHE vont se lier plus ou moins fortement aux constituants organiques (MO) et inorganiques (argiles ou oxydes de fer par exemple) (§3.2) et se retrouver séquestrés sur la phase solide induisant une réduction de leur biodisponibilité. Il aurait été intéressant d'observer l'évolution du C lié et encore extractible après les 21 jours d'expérience en prolongeant la cinétique pour observer une stabilisation, une augmentation ou même une diminution potentielle de la fraction non-extractible sur un temps plus long d'étude.

Afin d'identifier les composés organiques formant la fraction résiduelle du sol, des investigations plus détaillées ont été réalisées (§2). En effet, ces produits issus de la transformation du PHE peuvent être remobilisés (Gao et al., 2015) d'où l'importance de déterminer leur nature pour appréhender leur toxicité et leur impact sur les milieux. Dans le résidu solide extrait au solvant, le C issu du PHE ne semble plus être sous la forme de composé parent puisqu'aucun signal pour le PHE n'a été observé en pyGCMS, ni pour d'éventuels produits de cracking du PHE (résultats non présentés).

Cependant, localiser le C issu du PHE à l'échelle micrométrique sur ou à l'intérieur des agrégats de sol au cours du temps n'a pas donné de résultats concluants probablement en raison des limites imposées par l'appareil et des difficultés rencontrées lors de la préparation des échantillons.

## 2. Identification des composés organiques issus de la transformation du PHE

Du fait de la complexité de la matrice et du manque de sensibilité de certaines méthodes, les produits de transformation sont difficilement identifiables dans les sols. Les techniques de dégradation thermique (pyrolyse), de thermodesorption (TD) et de spectroscopie ( $^{13}\text{C}$ -RMN) ont été fréquemment utilisées pour caractériser les matières organiques naturelles et anthropiques et leur dynamique dans les sols. L'avantage de leur utilisation est qu'elles permettent de fournir des informations structurales. Mais la caractérisation des composés organiques au moyen de ces outils nécessite des méthodes de prétraitements.

Les premières analyses, destinées à l'identification des métabolites dans la fraction extractible, ont été réalisées en GCMS après une extraction du sol au solvant. Elles n'ont pas permis de déterminer des métabolites de type CAP oxygénés et/ou CAP azotés issus de la dégradation du PHE au cours de l'expérience. Ceci est sans doute lié au fait que les produits de dégradation ont une polarité plus élevée que le composé parent et ont ainsi pu favoriser la formation rapide de résidus liés. Ces produits ont pu à leur tour être dégradés, suivant leur accessibilité vis-à-vis des microorganismes.

Les analyses du sol et des fractions densimétriques en  $^{13}\text{C}$ -RMN à l'état solide et en TD/pyGCMS n'ont pas permis d'identifier de produits de dégradation marqués malgré les traitements appliqués sur le sol. Ces résultats pourraient être expliqués par l'utilisation d'une concentration trop faible en  $^{13}\text{C}$ -PHE qui est diluée deux fois : par la MO du sol qui présente déjà une abondance naturelle en  $^{13}\text{C}$  et par la dilution du  $^{13}\text{C}$ -PHE avec du PHE non marqué.

De plus, l'interprétation des données obtenues par pyrolyse et TD est complexe, et nécessite une très bonne connaissance du comportement des différents composés présents dans les matrices étudiées. Par exemple, un grand nombre de produits de pyrolyse obtenus peuvent provenir des composés constituant la MO naturelle (Saiz-Jimenez, 1994), d'où les difficultés d'interprétation des données de ce type d'analyse. Aussi, le signal du PHE est très fort et peut éventuellement masquer des molécules présentes mais en très faibles quantités. C'est pourquoi analyser le résidu solide (après extraction au solvant), qui ne contient plus ou qu'une faible quantité du composé parent, pourrait permettre de mettre en évidence d'éventuels produits de dégradation qui ne sont pas visibles dans le sol.

Toutefois, l'extraction de la MO hydrosoluble a permis de mettre en évidence des groupements fonctionnels dans lesquels un carbone apparaîtrait marqué compte tenu des différences observées entre les spectres « témoin » et « enrichi ». D'après les déplacements chimiques observés, le  $^{13}\text{C}$  serait retrouvé dans des groupements méthoxy, O-alkyle ou N-alkyle principalement. Il a, de ce fait, pu être incorporé dans des acides aminés, des bases azotées (puriques ou pyrimidiques) ou des osamines tels que le N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique, oses constitutifs des parois bactériennes mais qui sont aussi potentiellement identifiés dans les exsudats racinaires. Par ailleurs, le résidu DCM extrait à l'eau a révélé une diminution significative des concentrations en azote et une augmentation du rapport C/N suggérant une présence privilégiée des composés azotés dans l'extrait aqueux analysé en  $^{13}\text{C}$ -RMN. Richnow et al. (2000) ont aussi montré qu'une partie du C dérivé du phénanthrène marqué avait été transformée en composés microbiens typiques tels que des acides aminés, des carbohydrates et des acides gras.

La mesure du carbone isotopique de l'ADN total du sol (majoritairement microbien) a permis de mettre en évidence un léger enrichissement au cours du temps, privilégiant encore ici l'incorporation de  $^{13}\text{C}$  dans les cellules microbiennes.

### **3. Influence des phases minérales dans la distribution et la rétention des HAP**

La méthode de séparation densimétrique appliquée a permis de compartimenter les sols et d'isoler les MO libres des associations organo-minérales en vue d'élucider leur impact sur la dynamique des HAP dans un sol industriel pollué aux HAP et dans un sol planté et contaminé artificiellement par du PHE.

#### **3.1. Une localisation différente des HAP anciens et fraîchement ajoutés dans un sol industriel**

Les études portant sur les mécanismes régissant la dynamique des HAP, impliquent d'avoir recours à des conditions expérimentales simplifiées pour étudier les processus. Toutefois, pour comprendre comment est contrôlé le devenir des polluants dans un sol industriel, il est nécessaire d'être au plus près des conditions réelles. La distribution des HAP dans les sols pollués évolue au cours du temps, faisant intervenir des processus de

vieillessement et rendant de ce fait les contaminants moins disponibles. Nous avons choisi d'utiliser un sol historiquement contaminé avec ou sans apport d'une contamination fraîche afin d'étudier l'influence des minéraux dans la rétention des HAP anciens et nouvellement ajoutés. Cette étude visait à comprendre comment se distribuent les HAP au sein des associations organo-minérales mais en axant sur la minéralogie.

Une distribution non aléatoire des HAP a été observée entre les MO libres et complexées pour le sol industriel. La distribution entre les fractions densimétriques de chacun des 16 HAP est identique. Il n'y a pas de répartition préférentielle pour les HAP de bas et de haut poids moléculaire entre ces associations organo-minérales de densité variable. En revanche, la proportion des HAP de haut poids moléculaire a tendance à augmenter avec la densité des phases minérales contrairement aux HAP de bas poids moléculaire qui diminuent avec l'augmentation de la densité, comme l'ont observé Pernot et al. (2013).

Les HAP présents historiquement dans le sol d'Homécourt ont été retrouvés majoritairement associés à la MO libre.

En revanche, les HAP qui ont été fraîchement ajoutés ont été préférentiellement liés aux assemblages dans lesquels la MO est principalement associée au quartz, aux feldspaths et aux phyllosilicates. Les phases minérales pourraient de ce fait jouer un rôle dans la rétention des HAP fraîchement ajoutés au sol.

Toutefois, en raison des teneurs élevées en HAP anciens associés à la MO libre, cela suggère probablement un accès restreint des HAP fraîchement apportés vers la MO qui est peut-être enfermée à l'intérieur des particules de sol et donc faiblement accessible pour les contaminants récemment ajoutés (Ahn et al., 2005). Mais, il se peut aussi que les sites de sorption présents sur la MO anthropique non complexée soient saturés par les fortes quantités de HAP déjà présentes. La surface spécifique mesurée pour la MO libre est déjà très basse ( $3,0 \pm 2,1$ ) dans le sol témoin (qui n'a pas reçu de contamination fraîche). Les HAP fraîchement ajoutés aurait tendance à se sorber sur les surfaces externes des associations organo-minérales plus disponibles vis-à-vis des contaminants. La surface spécifique mesurée pour ces associations organo-minérales, contrairement à celle mesurée pour la MO libre, est élevée et diminue après apport de la contamination fraîche laissant supposer une adsorption des contaminants sur une partie de sites de sorption des fractions en question.

La rétention des HAP dans les sols peut être plus ou moins réversible, et selon le cas le polluant sera plus ou moins disponible dans le sol. Pour avoir des informations sur la biodisponibilité des HAP dans les fractions de sol étudiées, l'utilisation d'une technique

analytique comme la thermodésorption aurait pu être intéressante. De même que des mesures de biodisponibilité par des extractions chimiques utilisant la cyclodextrine (Stokes et al., 2005), le n-butanol (Ma et al., 2012) ou la résine Tenax par exemple (Ouvrard et al., 2011). La TD aurait pu fournir des informations sur les HAP étroitement séquestrés dans ces sols historiquement pollués et quelles associations organo-minérales contribuent davantage à la séquestration du polluant à long terme, et donc à la préservation de la pollution.

### 3.2. Le PHE ajouté artificiellement est lié aux associations organo-minérales dans la rhizosphère.

Le C issu du  $^{13}\text{C}$ -PHE semble s'accumuler préférentiellement aux associations organo-minérales liant les MO aux feldspaths, au quartz et à l'illite principalement. L'illite est reconnue comme étant un phyllosilicate exposant une grande surface spécifique, et est donc capable d'interagir étroitement avec la MO. De plus, même si les diffractogrammes ne permettent pas d'identifier clairement l'ensemble des phyllosilicates présents, la plupart de ces minéraux argileux présentent une densité  $\leq$  à  $2.7 \text{ g.cm}^{-3}$ . L'association préférentielle de la MO à ces minéraux a aussi été montrée sur les images NanoSIMS pour les agrégats de sol par une colocalisation forte entre les ions secondaires  $^{72}\text{OFe}^-$ ,  $^{28}\text{OAl}^-$ ,  $^{16}\text{O}^-$  distinguant les minéraux et  $^{27}\text{CN}^-$  désignant la MO. L'illite est le seul minéral qui a été identifié dans le sol étudié, composé aussi bien de Fe, d'Al et d'O. Après 14 jours, le C issu du PHE marqué est associé majoritairement à cette fraction dense (1.9-2.7). Une faible proportion de  $^{13}\text{C}$  a été retrouvée dans la fraction organique concentrant principalement les oxydes de fer mais reste constante dans le temps. Ce résultat peut suggérer des interactions fortes entre les minéraux argileux et les oxydes métalliques avec la matière organique engendrant la sorption et la stabilisation de cette dernière (Eusterhues et al., 2005; Hiemstra et al., 2010; Kleber et al., 2007).

### 3.3. Importance de la caractérisation des associations organo-minérales pour comprendre la distribution et la localisation des HAP

La méthode d'analyse choisie ici pour étudier la fraction minérale (DRX) permet uniquement de faire des mesures qualitatives, donnant une idée des phases minérales dominantes mais ne permettant pas de les quantifier. Par ailleurs, dans certaines fractions des minéraux très bien cristallisés comme le quartz peuvent « cacher » le signal d'autres phases

présentes mais moins bien cristallisées. Ainsi une analyse quantitative de la fraction minérale pourrait être menée par Microscopie Electronique à Transmission (MET) pour compléter cette analyse qualitative et apporter davantage d'informations pour le compartiment inorganique.

Le caractère fortement hydrophobe des MO leur confère une forte affinité vis-à-vis des HAP. Effectivement, il a été remarqué que les teneurs les plus élevées ont été retrouvées dans la fraction de MO non associées aux minéraux mettant en avant l'importance de la fraction organique sur le devenir des HAP comme l'ont jusqu'ici montré de nombreux auteurs (Chefetz and Xing, 2009; Murphy and Zachara, 1995; Pignatello, 1998; Simpson et al., 2003). Toutefois, la capacité de sorption des MO va aussi dépendre de leurs interactions avec les phases minérales du sol qui vont avoir une influence sur la surface d'échange des MO vis-à-vis des contaminants organiques (Hwang and Cutright, 2002). Donc, la fraction organique ne peut pas être utilisée seule pour prédire le comportement des HAP dans le sol. En effet, les minéraux peuvent jouer un rôle direct ou indirect dans la sorption des contaminants organiques (Bonin and Simpson, 2007; Northcott and Jones, 2001).

Par conséquent, il est essentiel de pouvoir caractériser aussi bien les phases minérales que les MO dans chaque fraction étudiée. Donc, afin de compléter les résultats obtenus, la caractérisation de l'ensemble des fractions densimétriques aurait pu être effectuée. L'identification des MO présentes, libres ou associées aux phases minérales, aurait pu être réalisée par résonance magnétique nucléaire ( $^{13}\text{C}$ -RMN) ou py/GCMS par exemple. En effet, la sorption des MO sur les minéraux dépend de leur réactivité mais aussi de la nature des MO. Lu et al. (2012) ont indiqué que la MO du sol, la surface spécifique et les minéraux seraient les 3 principaux facteurs affectant la distribution des HAP au sein des différentes particules organo-minérales.

### 3.4. Intérêts de l'utilisation d'une méthode de fractionnement densimétrique

Les méthodes de séparation physique des particules organiques et organo-minérales sont de plus en plus favorisées dans l'étude de la dynamique des HAP dans différents compartiments du sol (fractionnement granulométrique ou densimétrique). En effet, les techniques d'extraction chimique peuvent induire des modifications des MO ou des structures minérales, et de ce fait engendrer des biais dans les résultats et ne sont plus forcément adaptées dans l'étude du devenir des contaminants organiques dans les sols (Doick et al., 2005).

Par conséquent, nous avons choisi de privilégier le fractionnement par densimétrie pour étudier la distribution et la rétention des HAP dans les sols étudiés, qui à notre connaissance, n'a été utilisée qu'une seule fois à ce titre par Wilck and Krauss (2005) dans un sol. Cette méthode a aussi été utilisée pour identifier les composés organiques issus de la dégradation du PHE (§3).

La méthode de séparation par densimétrie semble avoir bien fonctionné, cependant elle induit des pertes importantes. Ces limites résident dans le fait qu'elle nécessite de nombreuses étapes : sonication, centrifugation et rinçage. Ces différentes étapes, et tout particulièrement l'étape de sonication, seraient à l'origine des pertes relativement importantes observées. La méthode de fractionnement pourrait être optimisée, notamment en faisant varier les temps et la puissance de sonication. Une partie importante des pertes en HAP peut être expliquée par la perte de MO dissoute ou colloïdale sur lesquelles aurait pu s'adsorber une quantité non négligeable de HAP. Certains débris végétaux semblent être des sorbants importants pour les HAP, et peuvent se retrouver dans la suspension aqueuse sous forme de colloïdes (MO libre ou associée à des particules argileuses par exemple) et ainsi entraîner la perte des HAP associés dans la phase aqueuse (Rockne, 2002).

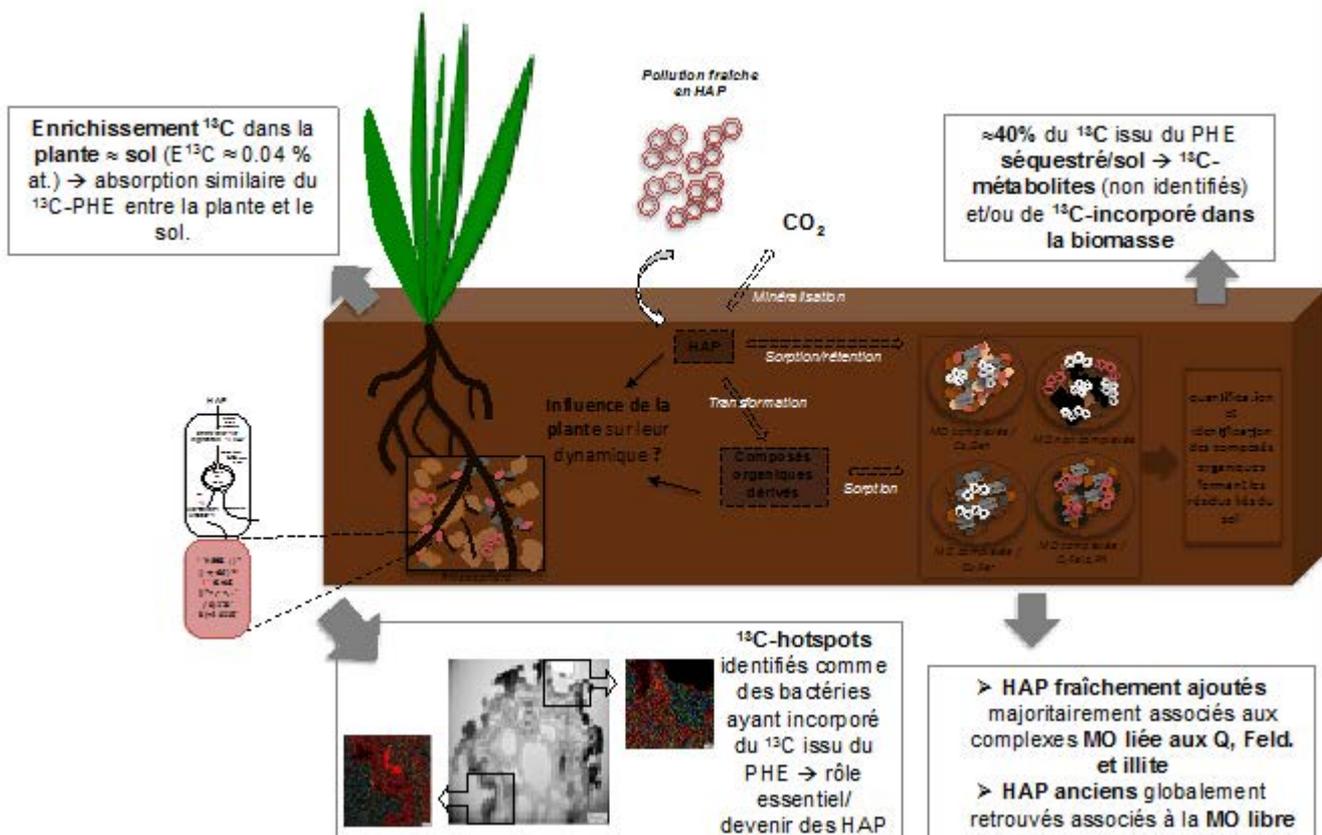


Figure VII-2. Synthèse des principales conclusions obtenues au cours de ce travail de thèse.

## Conclusion & Perspectives

L'utilisation de l'imagerie NanoSIMS couplée à l'expérimentation marquée a permis de suivre le devenir des HAP en descendant à des échelles très fines dans la rhizosphère et plus particulièrement à l'interface entre racines, microorganismes et sol. Des zones enrichies en carbone 13 (hotspots) autour de la racine ont ainsi été mises en évidence. Le  $^{13}\text{C}$  localisé sur les pourtours de la racine forme des spots de forme et de taille similaires aux bactéries suggérant que le  $^{13}\text{C}$  issu du phénanthrène a plutôt été incorporé dans les cellules bactériennes (**Figure VII-2**) après avoir été métabolisé. Ces résultats mettent en évidence le rôle significatif joué par les bactéries dans le devenir des HAP dans un sol soumis à l'influence d'une plante.

Aussi, l'incorporation du  $^{13}\text{C}$  dans les bactéries peut être appuyée par les résultats obtenus en  $^{13}\text{C}$ -RMN liquide qui montrent que le C marqué serait retrouvé dans des molécules provenant, par exemple, de composés azotés comme des acides aminés, des bases azotées ou encore des osamines (ou sucres aminés). Cette dernière famille comprend des N-acétylosamines, composés constituant le peptidoglycane (lui-même formant la paroi bactérienne). Ainsi, la biomasse microbienne pourrait représenter une part significative des 40% de  $^{13}\text{C}$  initialement ajoutés au sol et retrouvés dans le résidu non-extractible au solvant.

Cependant, l'ADN génomique total du sol extrait représente moins de 0,01% du  $^{13}\text{C}$ -résidu lié après 14 jours. Et, l'ADN total n'est pas uniquement bactérien mais peut aussi contenir des molécules d'ADN provenant de champignons ou de cellules végétales. Afin de discriminer et d'extraire uniquement l'ADN bactérien du sol, il faudrait utiliser un protocole permettant d'isoler les bactéries, par la méthode Nycodenz par exemple, avant de les lyser (Courtois et al., 2001). Pour compléter ces résultats, l'extraction de constituants majeurs des bactéries ayant pu incorporer le  $^{13}\text{C}$  pourrait être utilisée, comme par exemple les acides gras (biomarqueurs PLFA) (Bengtsson et al., 2010) ou les sucres aminés (Glaser et al., 2004) suivie d'une quantification du  $^{13}\text{C}$  par IRMS.

Il aurait été intéressant également, à partir des cellules bactériennes extraites par Nycodenz, de mesurer le rapport isotopique permettant ainsi de préciser l'enrichissement de ce compartiment. De plus, les bactéries extraites auraient pu être analysées par NanoSIMS afin d'y localiser le carbone marqué potentiellement incorporé. Il est possible d'agrandir davantage les images NanoSIMS (généralement de  $25 \times 25 \mu\text{m}$ ) à une taille de  $6 \times 6 \mu\text{m}$  pour plus de détails (Li et al., 2008a; Schurig et al., 2014). Des études comme celles de Musat et

al. (2012) ont démontré le potentiel de la NanoSIMS pour identifier, quantifier et visualiser l'incorporation d'un substrat marqué par des microorganismes seuls au sein de communautés microbiennes complexes. L'utilisation de ratios élémentaires dans le but de discriminer différentes zones d'une image NanoSIMS pourrait être optimisée pour localiser des bactéries de sol.

Aussi, dans notre cas, la microscopie électronique a été envisagée mais nécessite une préparation bien spécifique des échantillons, et plus particulièrement en MET où seules des lames minces sont analysées. La microscopie électronique permettrait de localiser les zones d'intérêts avant passage des échantillons en NanoSIMS (Carpenter et al., 2013; Moore et al., 2011). Et notamment de différencier les bactéries, les cellules racinaires et les particules minérales dans la rhizosphère (Jones et al., 2013).

Aucun métabolite de dégradation connu du PHE n'a été retrouvé en spectrométrie de masse (CG, pyrolyse et thermodésorption). Il a été difficile d'identifier les métabolites de dégradation dans le sol étant donné la complexité de la matrice. De plus, l'inoculum bactérien utilisé est très probablement constitué d'un mélange complexe de bactéries potentiellement actives, ce qui suggère l'utilisation de voies métaboliques variées pouvant produire des composés de dégradation multiples et dilués les uns par rapport aux autres, empêchant donc leur identification. De plus, l'ajout d'une concentration plus importante du contaminant marqué serait préféré pour ce type d'analyse. Il est difficile à partir de matrice complexe comme le sol, même après divers prétraitements, et contenant un marqueur très dilué d'obtenir des signaux provenant des composés marqués nouvellement synthétisés.

La méthode de fractionnement par densimétrie a été employée à deux reprises au cours de ce travail pour comprendre l'influence des phases minérales sur le comportement des HAP dans les sols. Sur (i) le sol forestier, contaminé artificiellement par le PHE entièrement disponible à T0 et planté, et (ii) le sol industriel qui possède, initialement une très faible biodisponibilité de la pollution (< 5% des HAP totaux), mais ayant reçu une contamination fraîche. Pour les deux sols, lorsque la pollution est ajoutée fraîchement elle est retrouvée préférentiellement associée aux fractions organo-minérales dans lesquelles la MO est principalement liée au quartz, aux feldspaths et aux phyllosilicates. En revanche, les HAP historiquement présents sont retrouvés majoritairement associés à la MO libre (**Figure VII-2**).

Toutefois, le sol naturel est composé de moins de <4% de MO naturelle alors que le sol historiquement contaminé possède environ 20% de MO anthropique et moins de 1% de MO naturelle. De plus, le sol historiquement contaminé et fraîchement pollué, a été mis à stabiliser à 4°C afin de favoriser les processus physico-chimiques et non les processus de dégradation biologique majoritaires dans le sol forestier (PHE). De plus, pour l'expérimentation  $^{13}\text{C}$ -PHE, ce n'est pas uniquement le PHE qui est suivi mais aussi les composés organiques associés qui peuvent avoir des comportements très différents dans les compartiments du sol à la différence du composé parent. Il paraît donc assez difficile de comparer le comportement des HAP au sein des compartiments organiques et organo-minéraux de ces deux sols.

Néanmoins, la distribution des HAP au sein des MO libres et associées aux minéraux dans le sol historiquement pollué pourrait être comparée à celle d'un autre sol présentant également une contamination ancienne mais avec une biodisponibilité des HAP supérieure à celle du sol d'Homécourt dont la biodisponibilité est très faible.

Le sol naturel marqué au  $^{13}\text{C}$ -PHE est rhizosphérique à la différence du sol industriel qui est non planté. Il pourrait être intéressant de comparer le sol rhizosphérique au sol non planté pour cette expérimentation pour observer l'effet de la plante sur la distribution du C issu du PHE dans les différents compartiments de sol. Pour le sol industriel, une plante pourrait être ajoutée après la phase de stabilisation de la contamination, avec un suivi temporel, pour comprendre le devenir des HAP fraîchement ajoutés au sein des associations organiques et organo-minérales et l'effet possible des plantes sur leur comportement, mais aussi l'impact de la plante sur le devenir des HAP initialement présents. Effectivement, la plante peut jouer un rôle majeur dans la dynamique des HAP et composés issus de sa transformation dans le sol par la synthèse d'exsudats racinaires notamment. L'apport d'une source de carbone supplémentaire peut diminuer la biodégradation des HAP (Louvel et al. 2010) et remobiliser une partie des HAP et composés dérivés présents dans la fraction non-extractible du sol (Gao et al., 2015).

L'étude du comportement et du devenir des HAP dans le sol et l'effet des plantes sur leur dynamique reste à approfondir, et notamment concernant (i) la formation des résidus liés et l'identification des composés associés et (ii) l'influence des particules minérales, organiques et organo-minérales du sol sur leur distribution et leur séquestration.



## Références bibliographiques



-A-

- ADEME, 2012. Taux d'utilisation et coûts des différentes techniques et filières de traitement des sols et des eaux souterraines polluées en France: synthèse des données 2008 91.
- Agarwal, T., Bucheli, T.D., 2011. Is black carbon a better predictor of polycyclic aromatic hydrocarbon distribution in soils than total organic carbon. ? *Environ. Pollut.* 159, 64–70.
- 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.
- Ahn, S., Werner, D., Luthy, R.G., 2005. Physicochemical characterization of coke-plant soil for the assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon availability and the feasibility of phytoremediation. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2185–2195.
- Alexander, M., 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4259–4265.
- Alexander, M., Hatzinger, P.B., Kelsey, J.W., Kottler, B.D., Nam, K., 1997. Sequestration and realistic risk from toxic chemicals remaining after bioremediation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 829, 1–5.
- Allard, A.-S., Remberger, M., Neilson, A.H., 2000. The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote-contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 46, 43–49.
- 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. Geochemistry* 16, 1611–1619.
- 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.
- Amellal, S., Boivin, A., Ganier, C.P., Schiavon, M., 2006. Effect of ageing on mobility and sequestration of phenanthrene in an agricultural soil. *Agron. Sustain. Dev.* 26, 269–275.
- Amelung, W., Zech, W., 1999. Minimisation of organic matter disruption during particle-size fractionation of grassland epipedons 73–85.
- Anderson, T.A., Guthrie, E., Walton, B.T., 1993. Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27, 2630–2636.
- Antizar-Ladislao, B., Lopez-Real, J., Beck, A.J., 2005. In-vessel composting-bioremediation of aged coal tar soil: Effect of temperature and soil/green waste amendment ratio. *Environ. Int.* 31, 173–178.
- 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.

Arshad, M.A., Rimpmeester, J.A., Schnitzer, M., 1988. Attempts to improve solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of whole mineral soils. *Can. J. soil Sci.* 68, 593–602.

Atlas, R.M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45, 180–209.

Audinot, J.N., Guignard, C., Migeon, H.N., Hoffmann, L., 2006. Study of the mechanism of diatom cell division by means of  $^{29}\text{Si}$  isotope tracing. *Appl. Surf. Sci.* 252, 6813–6815.

Audinot, J.N., Schneider, S., Yegles, M., Hallegot, P., Wennig, R., Migeon, H.N., 2004. Imaging of arsenic traces in human hair by nano-SIMS 50. *Appl. Surf. Sci.* 231–232, 490–496.

Aufdenkampe, A.K., Hedges, J.I., Richey, J.E., Krusche, A. V., Llerena, C. a., 2001. Sorptive fractionation of dissolved organic nitrogen and amino acids onto fine sediments within the Amazon Basin. *Limnol. Oceanogr.* 46, 1921–1935.

## -B-

Bailey, G.W., White, J.L., 1964. Review of adsorption and desorption of organic pesticides by soil colloids, with implications concerning pesticide bioactivity. *Agric. food Chem.* 12, 324–32.

Baisden, W.T., Amundson, R., Cook, A.C., Brenner, D.L., 2002. Turnover and storage of C and N in five density fractions from California annual grassland surface soils. *Global Biogeochem. Cycles* 16, 16–64.

Baldock, J.A., Oades, J.M., Waters, A.G., Peng, X., Vassallo, A.M., Wilson, M.A., 1992. Aspects of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Biogeochemistry* 16, 1–42.

Baldock, J.A., Skjemstad, J.O., 2000. Baldock, J. A., & Skjemstad, J. O. (2000). Role of the soil matrix and minerals in protecting natural organic materials against biological attack. *Organic Geochemistry*, 31, 697–710. *Org. Geochem.* 31, 697–710.

Baldock, J. a, Oades, J.M., Waters, a G., Peng, X., Vassallo, a M., Wilson, M. a, 1992. Aspects of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Biogeochemistry* 16, 1–42.

Balesdent, J., Chenu, C., Balabane, M., 2000. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil Tillage Res.* 53, 215–230.

Ball, W.P., Roberts, P. V, 1991. Long-term sorption of halogenated organic chemicals by aquifer material. 1. Equilibrium. *Environ. Sci. Technol.* 25, 1223–1237.

Bamforth, S.M., Singleton, I., 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 723–736.

- Bandowe, B.A.M., Shukurov, N., Kersten, M., Wilcke, W., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their oxygen-containing derivatives (OPAHs) in soils from the Angren industrial area, Uzbekistan. *Environ. Pollut.* 158, 2888–2899.
- Barriuso, E., Calvet, R., Schiavon, M., Soulas, G. Les pesticides et les polluants organiques des sols Transformations et dissipation 279–296.
- Basile-Doelsch, I., Amundson, R., Stone, W.E.E., Borschneck, D., Bottero, J.Y., Moustier, S., Masin, F., Colin, F., 2007. Mineral control of carbon pools in a volcanic soil horizon. *Geoderma* 137, 477–489.
- Bayard, R., Barna, L., Mahjoub, B., Gourdon, R., 2000. Influence of the presence of PAHs and coal tar on naphthalene sorption in soils. *J. Contam. Hydrol.* 46, 61–80.
- Behrens, S., Lösekann, T., Pett-Ridge, J., Weber, P.K., Ng, W.O., Stevenson, B.S., Hutcheon, I.D., Relman, D.A., Spormann, A.M., 2008. Linking microbial phylogeny to metabolic activity at the single-cell level by using enhanced element labeling-catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization (EL-FISH) and NanoSIMS. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3143–3150.
- Bengtsson, G., Törneman, N., Yang, X., 2010. Spatial uncoupling of biodegradation, soil respiration, and PAH concentration in a creosote contaminated soil. *Environ. Pollut.* 158, 2865–71.
- Berset, J.D., Ejem, M., Holzer, R., Lischer, P., 1999. Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. *Anal. Chim. Acta* 383, 263–275.
- Biache, C., 2010. Evolution des composants organiques d'un sol de cokerie en contexte d'atténuation naturelle.
- Biache, C., Faure, P., Mansuy-Huault, L., Cébron, A., Beguiristain, T., Leyval, C., 2013. Biodegradation of the organic matter in a coking plant soil and its main constituents. *Org. Geochem.* 56, 10–18.
- Biache, C., Ghislain, T., Faure, P., Mansuy-Huault, L., 2011. Low temperature oxidation of a coking plant soil organic matter and its major constituents: An experimental approach to simulate a long term evolution. *J. Hazard. Mater.* 188, 221–230.
- Biache, C., Kouadio, O., Lorgeoux, C., 2014. Impact of clay mineral on air oxidation of PAH-contaminated soils Author's personal copy. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 11017–11026.
- Biache, C., Lorgeoux, C., Saada, A., Faure, P., 2015. Behavior of PAH/mineral associations during thermodesorption: impact for the determination of mineral retention properties towards PAHs. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 3509–3516.
- Biache, C., Mansuy-Huault, L., Faure, P., Munier-Lamy, C., Leyval, C., 2008. Effects of thermal desorption on the composition of two coking plant soils: Impact on solvent extractable organic compounds and metal bioavailability. *Environ. Pollut.* 156, 671–677.

- Binet, P., Portal, J.M., Leyval, C., 2001. Application of GC–MS to the study of anthracene disappearance in the rhizosphere of ryegrass. *Org. Geochem.* 32, 217–222.
- Binet, P., Portal, J.M., Leyval, C., 2000a. Dissipation of 3-6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biol. Biochem.* 32, 2011–2017.
- Binet, P., Portal, J.M., Leyval, C., 2000b. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant Soil* 227, 207–213.
- Biswas, B., Sarkar, B., Rusmin, R., Naidu, R., 2015. Bioremediation of PAHs and VOCs : Advances in clay mineral – microbial interaction. *Environ. Int.* 85, 168–181.
- Blair, N., Prince, K.E., Faulkner, R.D., Till, a R., 2006. Using the scanning electron microprobe and secondary ion mass spectrometry to locate <sup>14</sup>C- and <sup>13</sup>C-labelled plant residues within soil aggregates. *Scanning* 28, 259–266.
- Blankenhorn, I., Meijer, D., van Delft, R.J., 1992. Inter-laboratory comparison of methods used for analysing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil samples. *Fresenius J. Anal. Chem.* 343, 497–504.
- Bogan, B.W., Sullivan, W.R., 2003. Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 52, 1717–26.
- Bollag, J.-M., Myers, C.J., Minard, R.D., 1992. Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. *Sci. Total Environ.* 123, 205–217.
- Bollag, J., Loll, M., 1983. Laboratory of Soil Microbiology , Department of Agronomy , The Pennsylvania State University , University Park. *Experientia* 39, 1221–1230.
- Bonin, J.L., Simpson, M.J., 2007. Variation in phenanthrene sorption coefficients with soil organic matter fractionation: the result of structure or conformation. *Environ. Sci. Technol.* 153–159.
- Bonnard, P., Basile-Doelsch, I., Balesdent, J., Masion, a., Borschneck, D., Arrouays, D., 2012. Organic matter content and features related to associated mineral fractions in an acid, loamy soil. *Eur. J. Soil Sci.* 63, 625–636.
- Bourceret, A., 2016. Variabilité spatio-temporelle des HAP et des communautés microbiennes dans la rhizosphère d'un sol historiquement contaminé par. University of Lorraine.
- Bourceret, A., Leyval, C., De Fouquet, C., Cébron, A., 2015. Mapping the centimeter-scale spatial variability of PAHs and microbial populations in the rhizosphere of two plants. *PLoS One* 10, 1–22.
- Breland, T.A., Bakken, L.R., 1991. Microbial growth and nitrogen immobilization in the root zone of barley (*Hordeum vulgare L.*), Italian ryegrass (*Lolium multiflorum Lam.*), and white clover (*Trifolium repens L.*). *Biol. Fertil. Soils* 12, 154–160.
- Bronick, C.J., Lal, R., 2005. Soil structure and management: A review. *Geoderma* 124, 3–22.

- Buco, S., Moragues, M., Doumenq, P., Noor, A., Mille, G., 2004. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil by Curie point pyrolysis coupled to gas chromatography-mass spectrometry, an alternative to conventional methods. *J. Chromatogr. A* 1026, 223–229.
- Burgos, W.D., Novak, J.T., Berry, D.F., 1996. Reversible sorption and irreversible binding of naphthalene and  $\alpha$ -naphthol to soil: elucidation of processes. *Environ. Sci.* 30, 1205–1211.
- Burken, J.G., Schnoor, J.L., 1998. Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3379–3385.

-C-

- Calvet, R., 2003. *Le sol : propriétés et fonctions*. p. 456.
- Carpenter, K.J., Weber, P.K., Davisson, M.L., Pett-Ridge, J., Haverty, M.I., Keeling, P.J., 2013a. Correlated SEM, FIB-SEM, TEM, and NanoSIMS imaging of microbes from the hindgut of a lower termite: methods for in situ functional and ecological studies of uncultivable microbes. *Microsc. Microanal. Off. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Canada* 19, 1490–501.
- Cébron, A., Louvel, B., Faure, P., France-Lanord, C., Chen, Y., Murrell, J.C., Leyval, C., 2011a. Root exudates modify bacterial diversity of phenanthrene degraders in PAH-polluted soil but not phenanthrene degradation rates. *Environ. Microbiol.* 13, 722–36.
- Celis, R., De Jonge, H., De Jonge, L.W., Real, M., Hermosin, M.C., Cornejo, J., 2006. The role of mineral and organic components in phenanthrene and dibenzofuran sorption by soil. *Eur. J. Soil Sci.* 57, 308–319.
- Cerniglia, C.E., 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19, 324–33.
- Cerniglia, C.E., 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current opinion in Biotechnology.* 4, 331–338.
- Chaîneau, C.H., Morel, J.L., Oudot, J., 2016. Biodegradation of Fuel Oil Hydrocarbons in the Rhizosphere of Maize. *Journal of Environmental Quality.* 29, 569–578.
- Chandra, S., Pumphrey, G., Abraham, J.M., Madsen, E.L., 2008. Dynamic SIMS ion microscopy imaging of individual bacterial cells for studies of isotopically labeled molecules. *Appl. Surf. Sci.* 255, 847–851.
- Chaudhry, Q., Blom-zandstra, M., Gupta, S., Joner, E.J., 2004. Review Articles Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–15.
- Chefetz, B., Deshmukh, A., Hatcher, P.G., Guthrie, E.A., 2000. Pyrene sorption by natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2925–2930.

- Chefetz, B., Xing, B., 2009. Relative role of aliphatic and aromatic moieties as sorption domains for organic compounds: A review. *Environ. Sci. Technol.* 43, 1680–1688.
- Chen, B., Yuan, M., 2012. Enhanced dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of fresh plant residues and their extracts. *Environ. Pollut.* 161, 199–205.
- Chen, D., Xing, B., Xie, W., 2007. Sorption of phenanthrene, naphthalene and o-xylene by soil organic matter fractions. *Geoderma* 139, 329–335.
- Chen, J.L., Au, K.C., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2010. Using orthogonal design to determine optimal conditions for biodegradation of phenanthrene in mangrove sediment slurry. *J. Hazard. Mater.* 176, 666–671.
- Chenu, C., Plante, A.T., 2006. Clay-sized organo-mineral complexes in a cultivation chronosequence: Revisiting the concept of the “primary organo-mineral complex.” *Eur. J. Soil Sci.* 57, 596–607.
- Chevallier, T., Muchaonyerwa, P., Chenu, C., 2003. Microbial utilisation of two proteins adsorbed to a vertisol clay fraction: Toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* and bovine serum albumin. *Soil Biol. Biochem.* 35, 1211–1218.
- Chiapusio, G., Pujol, S., Toussaint, M.L., Badot, P.M., Binet, P., 2007. Phenanthrene toxicity and dissipation in rhizosphere of grassland plants (*Lolium perenne* L. and *Trifolium pratense* L.) in three spiked soils. *Plant Soil* 294, 103–112.4
- Chiou, C.T., McGroddy, S.E., Kile, D.E., 1998. Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.* 32, 264–269.
- Christensen, B.T., 1992. Physical Fractionation of Soil and Organic Matter in Primary Particle Size and Density Separates. pp. 405–411.
- Chung, N., Alexander, M., 1998. Differences in sequestration and bioavailability of organic compounds aged in dissimilar soils. *Environ. Sci. Technol.* 32, 855–860.
- Cliff, J.B., Gaspar, D.J., Bottomley, P.J., Myrold, D.D., 2002. Exploration of inorganic C and N assimilation by soil microbes with time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4067–4073.
- Clode, P.L., Kilburn, M.R., Jones, D.L., Stockdale, E. a, Cliff, J.B., Herrmann, A.M., Murphy, D. V, 2009. In situ mapping of nutrient uptake in the rhizosphere using nanoscale secondary ion mass spectrometry. *Plant Physiol.* 151, 1751–1757.
- Clode, P.L., Stern, R.A., Marshall, A.T., 2007. Subcellular Imaging of Isotopically Labeled Carbon Compounds in a Biological Sample by Ion Microprobe (NanoSIMS). *Microsc. Res. Tech.* 70, 220–229.
- Cofield, N., Banks, M.K., Schwab, a P., 2008. Lability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *Chemosphere* 70, 1644–52.
- Cofield, N., Schwab, a P., Banks, M.K., 2007. Phytoremediation of polycyclic aromatic

- hydrocarbons in soil: part I. Dissipation of target contaminants. *Int. J. Phytoremediation* 9, 355–370.
- Conte, P., Zena, A., Pilidis, G., Piccolo, A., 2001. Increased retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils induced by soil treatment with humic substances. *Environ. Pollut.* 112, 27–31. 9
- Corgié, S.C., Beguiristain, T., Leyval, C., 2004. Spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium* spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. 70, 3552–3557.
- Corgié, S.C., F., F., Beguiristain, T., Leyval, C., 2006. Biodegradation of phenanthrene , spatial distribution of bacterial populations and dioxygenase expression in the mycorrhizosphere of *Lolium perenne* inoculated with *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 16, 207–212.
- Corgié, S.C., Joner, E.J., Leyval, C., 2003. Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. *Plant Soil* 257, 143–150.
- Cornelissen, G., Breedveld, G.D., Kalaitzidis, S., Christanis, K., Kibsgaard, A., Oen, A.M.P., 2006. Strong sorption of native PAHs to pyrogenic and unburned carbonaceous geosorbents in sediments. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1197–1203.
- Cornelissen, G., Gustafsson, Ö., Bucheli, T.D., Jonker, M.T., Koelmans, A., van Noort, P.C.M., 2005. Extensive sorption of organic compounds to black carbon , coal , and kerogen in sediments and soils : mechanisms and consequences for partners. *Environ. Sci. Technol.* 39, 6881–6895.
- Courtois, S., Frostegard, A., Goransson, P., Depret, G., Jeannin, P., Simonet, P., 2001. Quantification of bacterial subgroups in soil: Comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environ. Microbiol.* 3, 431–439.
- Crampon, M., 2015. Influence des facteurs biogéochimiques et de l'ajout de biosurfactant sur la biodégradation des HAP dans des sols contaminés. Université de Rouen.
- Crow, S.E., Swanston, C.W., Lajtha, K., Brooks, J.R., Keirstead, H., 2007. Density fractionation of forest soils: Methodological questions and interpretation of incubation results and turnover time in an ecosystem context. *Biogeochemistry* 85, 69–90.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W., 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.*
- Curtis, G., Reinhard, M., Roberts, P. V, 1986. Sorption of hydrophobic organic compounds by sediments, in: J.A. Davis & K.F. Hayes (Ed.), *Geochemical Processes and Mineral Surfaces*. Washington, DC, pp. 192–216.
- Cutright, T.J., 1995. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation and Kinetics Using *Cunninghamella echinulatu* var . *elegans*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 35, 397–408.

Dagois, R., 2015. Thèse de Technosols sous influences climatiques contrastées.

-D-

Davis, L.C., Castro-diaz, S., Zhang, Q., Erickson, L.E., Davis, L.C., Castro-diaz, S., Zhang, Q., Larry, E., 2002. Critical Reviews in Plant Sciences Benefits of Vegetation for Soils with Organic Contaminants Benefits of Vegetation for Soils with Organic Contaminants. CRC. Crit. Rev. Plant Sci. 21, 457–491.

de Junet, A., 2008. Caractérisation et dynamique des matières organiques stabilisées au sein des complexes organo-minéraux de sols tropicaux. Université de La Réunion.

de Junet, A., Basile-Doelsch, I., Borschneck, D., Masion, A., Legros, S., Marol, C., Balesdent, J., Templier, J., Derenne, S., 2013. Characterisation of organic matter from organo-mineral complexes in an Andosol from Reunion Island. J. Anal. Appl. Pyrolysis 99, 92–100.

De la Rosa, J.M., Knicker, H., López-Capel, E., Manning, D. a. C., González-Perez, J. a., González-Vila, F.J., 2008. Direct detection of Black Carbon in soils by Py-GC/MS, Carbon-13 NMR Spectroscopy and Thermogravimetric Techniques. Soil Sci. Soc. Am. J. 72, 258.

Dean-ross, D., Moody, J.D., Freeman, J.P., Doerge, D.R., Cerniglia, C.E., 2001. Metabolism of anthracene by a *Rhodococcus species* 204, 205–211.

Del Rio, J.C., Hatcher, P.G., 1998. Analysis of aliphatic biopolymers using thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) and gas chromatography-mass spectrometry. Org. Geochem. 29, 1441–1451.

Derito, C.M., Pumphrey, G.M., Madsen, L., Madsen, E.L., 2005. Use of Field-Based Stable Isotope Probing To Identify Adapted Populations and Track Carbon Flow through a Phenol-Degrading Soil Microbial Community Use of Field-Based Stable Isotope Probing To Identify Adapted Populations and Track Carbon Flow through a P. Appl. Environ. Microbiol. 71, 7858–7865.

Desalme, D., Binet, P., Bernard, N., Gilbert, D., Toussaint, M.L., Chiapusio, G., 2011. Atmospheric phenanthrene transfer and effects on two grassland species and their root symbionts: a microcosm study. Environ. Exp. Bot. 71, 146–151.

Dignac, M., Houot, S., Derenne, S., 2006. How the polarity of the separation column may influence the characterization of compost organic matter by pyrolysis-GC / MS. J. Anal. Appl. Pyrolysis 75, 128–139.

Dijkshoorn.W., Van Wijk.L., 1967. The sulphur requirements of plants evidenced by the sulphur-nitrogen ratio in the organic matter a review of published data. Plant Soil 26, 129–157.

Doick, K.J., Burauel, P., Jones, K.C., Semple, K.T., 2005. Distribution of aged <sup>14</sup>C-PCB and <sup>14</sup>C-PAH residues in particle-size and humic fractions of an agricultural soil. Environ.

Sci. Technol. 39, 6575–6583.

Duchaufour, P., 1984. Abrege de pedologie [1984].

Duchaufour, P., Masson, B.S., 1983. Pédologie : pédogénèse et classification, 2ème édition revue et augmentée, Masson. ed. Paris.

Duchêne, J., Isler, D., Yax, E., 1991. Élaboration du métal primaire - Coke métallurgique - Fabrication du coke métallurgique, in: Techniques de L'ingénieur.

Dupuy, J., Leglize, P., Vincent, Q., Zelko, I., Mustin, C., Ouvrard, S., Sterckeman, T., 2016. Effect and localization of phenanthrene in maize roots. *Chemosphere* 149, 130–136.

## -E-

Edwards, N.T., 1983. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Terrestrial Environment - A Review. *J. Environ. Qual.* 12, 427–441.

Eschenbach, A., Wienberg, R., Mahro, B., 1998. Fate and stability of nonextractable residues of [<sup>14</sup>C] in contaminated soils under environmental stress conditions. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2585–2590.

Eusterhues, K., Rumpel, C., Kögel-Knabner, I., 2007. Composition and radiocarbon age of HF-resistant soil organic matter in a Podzol and a Cambisol. *Org. Geochem.* 38, 1356–1372.

Eusterhues, K., Rumpel, C., Kögel-Knabner, I., 2005. Organo-mineral associations in sandy acid forest soils: Importance of specific surface area, iron oxides and micropores. *Eur. J. Soil Sci.* 56, 753–763.

Eybe, T., Audinot, J.N., Bohn, T., Guignard, C., Migeon, H.N., Hoffmann, L., 2008. NanoSIMS 50 elucidation of the natural element composition in structures of cyanobacteria and their exposure to halogen compounds. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1502–1510.

Eybe, T., Bohn, T., Audinot, J.N., Udelhoven, T., Cauchie, H.M., Migeon, H.N., Hoffmann, L., 2009. Uptake visualization of deltamethrin by NanoSIMS and acute toxicity to the water flea *Daphnia magna*. *Chemosphere* 76, 134–140.

## -F-

Fang, C., Radosevich, M., Fuhrmann, J.J., 2001. Atrazine and phenanthrene degradation in grass rhizosphere soil. *Soil Biol. Biochem.* 33, 671–678.

Feng, X., Simpson, A.J., Simpson, M.J., 2006. Investigating the role of mineral-bound humic acid in phenanthrene sorption. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3260–3266.



- Gabet, S., 2004. Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique.
- Gaboriau, H., Saada, a, 2001. Influence of heavy organic pollutants of anthropic origin on PAH retention by kaolinite. *Chemosphere* 44, 1633–9.
- Galli Marxer, C., Kraft, M.L., Weber, P.K., Hutcheon, I.D., Boxer, S.G., 2005. Supported Membrane Composition Analysis by Secondary Ion Mass Spectrometry with High Lateral Resolution. *Biophys. J.* 88, 2965–2975
- Gao, Y.-Z., Zhu-Li-Zhong, 2005. Phytoremediation for phenanthrene and pyrene contaminated soils. *J. Environ. Sci.*
- Gao, Y., Yuan, X., Lin, X., Sun, B., Zhao, Z., 2015. Low-molecular-weight organic acids enhance the release of bound PAH residues in soils. *Soil Tillage Res.* 145, 103–110. doi:10.1016/j.still.2014.09.008
- Gao, Y., Zhu, L., 2004. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere* 55, 1169–78. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.01.037
- Garbarinit, D.R., Llon, L.W., 1986. Influence of the nature of soil organics on the sorption of toluene and trichloroethylene. *Environ. Sci. Technol.* 20, 1263–1269.
- Garbisu, C., Alkorta, I., 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresour. Technol.* 77, 229–236.
- Gerhardt, K.E., Huang, X., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2008. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants : Potential and challenges. *Plant Sci.* 176, 20–30.
- Gevao, B., Semple, K.T., Jones, K.C., 2000. Bound pesticide residues in soil: a review. *Environ. Pollut.* 108, 3–14.
- Ghanem, A., Orazio, V.D., Senesi, N., 2010. Phytotoxicity assay of selected plants to pyrene contaminated soil 74–77.
- Ghislain, T., Faure, P., Biache, C., Michels, R., 2010. Air Oxidation : A possible new pathway for PAH stabilization in sediments and soils 44, 8547–8552.
- Glaser, B., Turrión, M.-B., Alef, K., 2004. Amino sugars and muramic acid-biomarkers for soil microbial community structure analysis. *Soil Biol. Biochem.* 36, 399–407.
- Gobat, Aragno, Matthey, 2010. Livre - Le sol vivant : bases de pédologie ; biologie des sols (3e édition)
- Golchin, A., Oades, J.M., Skjemstad, J.O., Clarke, P., 1995. Structural and dynamic properties of soil organic-matter as reflected by <sup>13</sup>C natural-abundance, pyrolysis mass-

- spectrometry and solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR-spectroscopy in density fractions of an oxisol under forest and pasture. *Soil Res.* 33, 59–76.
- Golchin, a, Clarke, P., Oades, J.M., 1996. The heterogeneous nature of microbial products as shown by solid-state  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectroscopy. *Biogeochemistry* 34, 71–97.
- Goodin, J.D., Webber, M.D., 1995. Persistence and fate of anthracene and benzo[a]pyrene in municipal sludge treated soil. *J. Environ. Qual.* 24, 271–278.
- Grathwohl, P., 1990. Influence of organic matter from soils and sediments from various origins on the sorption of some chlorinated aliphatic hydrocarbons: implications on Koc correlations. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1687–1693.
- Guerquin-Kern, J.L., Wu, T.D., Quintana, C., Croisy, A., 2005. Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy). *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1724, 228–238.
- Guggenberger, G., Christensen, B.T., Zech, W., 1994. Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soil : I . Lignin and carbohydrate signature. *Eur. J. Soil Sci.* 449–458.
- Guggenberger, G., Kaiser, K., 2003. Dissolved organic matter in soil : challenging the paradigm of sorptive preservation. *Geoderma* 113, 293–310.
- Guggenberger, G., Pichler, M., Hartmann, R., Zech, W., 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons in different forest soils: Mineral horizons. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkd.* 159, 565–573.
- Guigue, J., Mathieu, O., Lévêque, J., Mounier, S., Laffont, R., Maron, P. a., Navarro, N., Chateau, C., Amiotte-Suchet, P., Lucas, Y., 2014. A comparison of extraction procedures for water-extractable organic matter in soils. *Eur. J. Soil Sci.* 65, 520–530.
- Günther, T., Dornberger, U., Fritsche, W., 1996. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 33, 203–215.
- Guthrie, E.A., Pfaender, F.K., 1998. Reduced pyrene bioavailability in microbially active soils. *Environ. Sci. Technol.* 32, 501–508.
- Guthrie, E. a, Bortiatynski, J.M., Hardy, K.S., Kovach, E.M., Hatcher, P.G., 1999. Determination of [  $^{13}\text{C}$  ] Pyrene Sequestration in Sediment Microcosms Using Flash Pyrolysis-GC-MS and  $^{13}\text{C}$  NMR 33, 119–125.



- Haeseler, F., Blanchet, D., Druelle, V., Werner, P., Vandecasteele, J.P., 1999. Ecotoxicological assessment of soils of former manufactured gas plant sites: Bioremediation potential and pollutant mobility. *Environ. Sci. Technol.* 33, 4379–4384. doi:10.1021/es990203r

- Hallégot, P., Audinot, J.-N., Migeon, H.-N., 2006. Direct NanoSIMS imaging of diffusible elements in surfaced block of cryo-processed biological samples. *Appl. Surf. Sci.* 252, 6706–6708.
- Hallégot, P., Peteranderl, R., Lechene, C., 2004. In-situ imaging mass spectrometry analysis of melanin granules in the human hair shaft. *J. Invest. Dermatol.* 122, 381–386.
- Haritash, a. K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1–15.
- Hartmann, R., 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in forest soils: Critical evaluation of a new analytical procedure. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 62, 161–173.
- Hatcher, P.G., Clifford, D.J., 1994. Flash pyrolysis and in situ methylation of humic acids from soil. *Org. Geochem.* 21, 1081–1092.
- Hatton, P.-J., Remusat, L., Zeller, B., Derrien, D., 2012. A multi-scale approach to determine accurate elemental and isotopic ratios by nano-scale secondary ion mass spectrometry imaging. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26, 1363–71.
- Hatton, P.J., Remusat, L., Zeller, B., Brewer, E.A., Derrien, D., 2015. NanoSIMS investigation of glycine-derived C and N retention with soil organo-mineral associations. *Biogeochemistry* 125, 303–313.
- Hatzinger, P.B., Alexander, M., 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.* 29, 537–545
- Heim, A., Schmidt, M.W.I., 2007. Lignin turnover in arable soil and grassland analysed with two different labelling approaches. *Eur. J. Soil Sci.* 58, 599–608.
- Heister, K., Höschel, C., Pronk, G.J., Mueller, C.W., Kögel-Knabner, I., 2012. NanoSIMS as a tool for characterizing soil model compounds and organomineral associations in artificial soils. *J. Soils Sediments* 12, 35–47.
- Heister, K., Höschel, C., Pronk, G.J., Mueller, C.W., Kögel-Knabner, I., 2011. NanoSIMS as a tool for characterizing soil model compounds and organomineral associations in artificial soils. *J. Soils Sediments* 12, 35–47.
- Herrmann, A., Clode, P.L., Fletcher, I.R., Nunan, N., Stockdale, E.A., O'Donnell, A.G., Murphy, D. V., 2007a. A novel method for the study of the biophysical interface in soils using nano-scale secondary ion mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 29–34.
- Herrmann, A., Ritz, K., Nunan, N., Clode, P.L., Pett-Ridge, J., Kilburn, M.R., Murphy, D. V., O'Donnell, A.G., Stockdale, E. a., 2007b. Nano-scale secondary ion mass spectrometry — A new analytical tool in biogeochemistry and soil ecology: A review article. *Soil Biol. Biochem.* 39, 1835–1850.
- Herrmann, A.M., Ritz, K., Nunan, N., Clode, P.L., Pett-Ridge, J., Kilburn, M.R., Murphy, D. V., O'Donnell, A.G., Stockdale, E.A., 2007. Nano-scale secondary ion mass

- spectrometry - A new analytical tool in biogeochemistry and soil ecology: A review article. *Soil Biol. Biochem.* 39, 1835–1850.
- Hiemstra, T., Antelo, J., Rahnemaie, R., Riemsdijk, W.H. van, 2010. Nanoparticles in natural systems I: The effective reactive surface area of the natural oxide fraction in field samples. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74, 41–58..
- Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D., Young, I.M., 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant Soil* 321, 117–152.
- Hinsinger, P., Hinsinger, P., Gobran, G.R., Gregory, P.J., Wenzel, W.W., 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol.* 168, 293–303.
- Hoppe, P., Cohen, S., Meibom, A., 2013. NanoSIMS: technical aspects and applications in cosmochemistry and biological geochemistry. *Geostand. Geoanalytical Res.* 37, 111–154.
- Howsam, M., Jones, K., 1998. Sources of PAHs in the environment. *Handb. Environ. Chem.* 3, 137-174.
- Huang, W., Weber, W.J., 1998. A Distributed Reactivity Model for Sorption by Soils and Sediments. 11. Slow Concentration-Dependent Sorption Rates. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3549–3555.
- Hundal, L., Thompson, M., Laird, D., Carmo, A., 2001. Sorption of phenantrene by reference smectites. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3456–3461.
- Hwang, S., Cutright, T.J., 2002. Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. *Chemosphere* 47, 891–899.
- Hwang, S., Cutright, T.J., Cutright, T.J., 2002. Impact of clay minerals and DOM on the competitive sorption/desorption of PAHs. *Soil Sediment Contam.* 11, 269–291.

-J-

- Joner, E., Leyval, C., Joner, E., Leyval, C., 2003. Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants : a new aspect of rhizosphere interactions. *Agronomie.* 23, 495-502
- Joner, E.J., Corgie, S.C., Amellal, N., Leyval, C., 2002. Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 34, 859–864.
- 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, 429–35.
- 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.
- Jones, D.L., Clode, P.L., Kilburn, M.R., Stockdale, E.A., Murphy, D. V., 2013. Competition between plant and bacterial cells at the microscale regulates the dynamics of nitrogen acquisition in wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytol.* 200, 796–807.
- Jones, K.C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environ. Pollut.* 81, 229–249.
- Jones, K.C., Grimmer, G., Jacob, J., Johnston, A.E., 1989. Changes in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of wheat grain and pasture grassland over the last century from one site in the U.K. *Sci. Total Environ.* 78, 117–130.
- 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.
- 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. Biodegradation* 45, 57–88.
- K-
- Käcker, T., Haupt, E.T.K., Garms, C., Francke, W., Steinhart, H., 2002. Structural characterisation of humic acid-bound PAH residues in soil by <sup>13</sup>C-CPMAS-NMR-spectroscopy: evidence of covalent bonds. *Chemosphere* 48, 117–31.
- Kahle, M., Kleber, M., Jahn, R., 2004. Retention of dissolved organic matter by phyllosilicate and soil clay fractions in relation to mineral properties 35, 269–276.
- Kaiser, K., Guggenberger, G., 2003. Mineral surfaces and soil organic matter. *Eur. J. Soil Sci.* 54, 219–236.
- Kamath, R., Schnoor, J.L., Alvarez, P.J.J., 2005. A model for the effect of rhizodeposition on the fate of phenanthrene in aged contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9669–9675.
- Kanally, R.A., Harayama, S., 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182, 2059–2067.
- Kaneda, T., 1991. Iso-and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic Significancet. *Microbiol. Rev.* 55, 288–302.
- Kang, F., Chen, D., Gao, Y., Zhang, Y., 2010. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcellular root tissues of ryegrass (*Lolium multiflorum Lam.*). *BMC Plant Biol.* 10, 210.
- Karimi-lotfabad, S., Samples, C., 1996. Reactions of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons on

- Soil Physical and Chemical Characteristics of Soil and 30, 1145–1151.
- Karthikeyan, R., Kulakow, P.A., 2003. Soil Plant Microbe Interactions in Phytoremediation, in: Phytoremediation. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, pp. 52–74.
- Kästner, M., Breuer-Jammali, M., Mahro, B., 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 267–273.
- Kästner, M., Streibich, S., Beyrer, M., Richnow, H.H., Ka, M., 1999. Formation of bound residues during microbial degradation of [<sup>14</sup>C] anthracene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1834–1842
- Keiluweit, M., Bougoure, J.J., Nico, P.S., Pett-Ridge, J., Weber, P.K., Kleber, M., 2015. Mineral protection of soil carbon counteracted by root exudates. *Nat. Clim. Chang.* 5, 588–595.
- Keiluweit, M., Bougoure, J.J., Zeglin, L.H., Myrold, D.D., Weber, P.K., Pett-Ridge, J., Kleber, M., Nico, P.S., 2012. Nano-scale investigation of the association of microbial nitrogen residues with iron (hydr)oxides in a forest soil O-horizon. *Geochim. Cosmochim. Acta* 95, 213–226.
- Kelley, I., Freeman, J.P., Evans, F.E., Cerniglia, C.E., 1993. Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by mycobacterium sp . Strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 800–806.
- Kennedy, M.J., Pevear, D.R., Hill, R.J., 2002. Mineral surface control of organic carbon in black shale. *Science.* 295, 657–660.
- Kertesz, M. a., Mirleau, P., 2004. The role of soil microbes in plant sulphur nutrition. *J. Exp. Bot.* 55, 1939–1945.
- 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.
- Kirk, J.L., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T., 2005. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environ. Pollut.* 133, 455–65.
- Kleber, M., Sollins, P., Sutton, R., 2007. A conceptual model of organo-mineral interactions in soils: Self-assembly of organic molecular fragments into zonal structures on mineral surfaces. *Biogeochemistry* 85, 9–24.
- Kleinfeld, A.M., Kampf, J.P., Lechene, C., 2004. Transport of <sup>13</sup>C-oleate in adipocytes measured using multi imaging mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15, 1572–1580.
- Knicker, H., 2007. How does fire affect the nature and stability of soil organic nitrogen and carbon? A review. *Biogeochemistry* 85, 91–118.

- Knicker, H., 2004. Stabilization of N-compounds in soil and organic-matter-rich sediments - What is the difference? *Mar. Chem.* 92, 167–195.
- Kogel-Knabner, I., 2000. Analytical approaches for characterizing soil organic matter. *Org. Geochem.* 31, 609–625.
- Kogel-Knabner, I., 1997.  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR spectroscopy as a tool in soil organic matter studies. *Geoderma* 80, 243–270.
- Kögel-Knabner, I., Guggenberger, G., Kleber, M., Kandeler, E., Kalbitz, K., Scheu, S., Eusterhues, K., Leinweber, P., 2008. Organo-mineral associations in temperate soils: Integrating biology, mineralogy, and organic matter chemistry. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 171, 61–82.
- Kopinke, F., Georgi, A., MacKenzie, K., 2001. Sorption of pyrene to dissolved humic substances and related structure - property correlation 35, 2536–2542.:
- Krauss, M., Wilcke, W., 2005. Persistent organic pollutants in soil density fractions: distribution and sorption strength. *Chemosphere* 59, 1507–1515.
- Krauss, M., Wilcke, W., Zech, W., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in forest soils: depth distribution as indicator of different fate. *Environ. Pollut.* 110, 79–88.
- Krein, A., Udelhoven, T., Audinot, J.N., Hissler, C., Guignard, C., Pfister, L., Migeon, H.N., Hoffmann, L., 2008. Imaging chemical patches on near-surface atmospheric dust particles with NanoSIMS 50 to identify material sources. *Water, Air, Soil Pollut. Focus* 8, 495–503.
- Krull, E.S., Swanston, C.W., Skjemstad, J.O., McGowan, J.A., 2006. Importance of charcoal in determining the age and chemistry of organic carbon in surface soils. *J. Geophys. Res.* 111, 1–9.
- 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.
- Kukkonen, J., Landrum, P.F., 1996. Distribution of organic carbon and organic xenobiotics. 32, 1063–1076.
- Kumar, R., Pandey, S., Pandey, A., 2006. Plant roots and carbon sequestration. *Curr. Sci.* 91, 885–890.
- Kuypers, M.M.M., Jorgensen, B.B., 2007. The future of single-cell environmental microbiology. *Environ. Microbiol.* 9, 6–7.
- Kwon, S., Pignatello, J.J., 2005. Effect of natural organic substances on the surface and adsorptive properties of environmental Black Carbon (Char): pseudo pore blockage by model lipid components and its implications for  $\text{N}_2$  - probed surface properties of natural sorbents. *Environ. Sci. Technol.* 39, 7932–7939.

## -L-

- Lahlou, M., Ortega-Calvo, J.-J., 1999. Bioavailability of labile and desorption resistant – phenanthrene sorbed to montmorillonite clay containing humic fractions. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2729–2735.
- 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.
- Lechene, C., Hillion, F., McMahon, G., Benson, D., Kleinfeld, A.M., Kampf, J.P., Distel, D., Luyten, Y., Bonventre, J., Hentschel, D., Park, K.M., Ito, S., Schwartz, M., Benichou, G., Slodzian, G., 2006. High-resolution quantitative imaging of mammalian and bacterial cells using stable isotope mass spectrometry. *J. Biol.* 5, 1–30.
- Lehmann, J., Kinyangi, J., Solomon, D., 2007. Organic matter stabilization in soil microaggregates: implications from spatial heterogeneity of organic carbon contents and carbon forms. *Biogeochemistry* 85, 45–57.
- Li, H., Chen, J., Wu, W., Piao, X., 2010. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in different size fractions of soil from a coke oven plant and its relationship to organic carbon content. *J. Hazard. Mater.* 176, 729–734.
- Li, T., Wu, T. Di, Mazéas, L., Toffin, L., Guerquin-Kern, J.L., Leblon, G., Bouchez, T., 2008. Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS. *Environ. Microbiol.* 10, 580–588.
- Liste, H.H., Alexander, M., 2000. Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere* 40, 7–10.
- Lombi, E., Hettiarachchi, G.M., Scheckel, K.G., 2011. Advanced in situ spectroscopic techniques and their applications in environmental biogeochemistry: introduction to the special section. *J. Environ. Qual.* 40, 659–66.
- Lorenzi, D., Cave, M., Dean, J.R., 2010. An investigation into the occurrence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in two soil size fractions at a former industrial site in NE England, UK using in situ PFE-GC-MS. *Environ. Geochem. Health* 32, 553–565.
- Louvel, B., 2010. Etude en microcosmes de l'effet du ray-grass et de ses exsudats racinaires sur la dissipation des HAP et les communautés bactériennes dégradantes.
- Lu, X.Q., Hanna, J. V, Johnson, W.D., 2000. Source indicators of humic substances: An elemental composition, solid state  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR and Py-GC/MS study. *Appl. Geochemistry* 15, 1019–1033.
- Lu, Z., Zeng, F., Xue, N., Li, F., 2012. Occurrence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in organo-mineral particles of alluvial sandy soil profiles at a petroleum-contaminated site. *Sci. Total Environ.* 433, 50–57.

- Lundstedt, S., 2003. Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes.
- Lundstedt, S., Bandowe, B. a. M., Wilcke, W., Boll, E., Christensen, J.H., Vila, J., Grifoll, M., Faure, P., Biache, C., Lorgeoux, C., Larsson, M., Frech Irgum, K., Ivarsson, P., Ricci, M., 2014. First intercomparison study on the analysis of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (oxy-PAHs) and nitrogen heterocyclic polycyclic aromatic compounds (N-PACs) in contaminated soil. *TrAC Trends Anal. Chem.* 57, 83–92.
- Lundstedt, S., Persson, Y., Öberg, L., 2006. Transformation of PAHs during ethanol-Fenton treatment of an aged gasworks' soil. *Chemosphere* 65, 1288–1294.
- Lundstedt, S., White, P.A., Lemieux, C.L., Lynes, K.D., Iain, B., Öberg, L., Haglund, P., Tysklind, M., Lundstedt, S., White, P.A., Lemieux, C.L., Lynes, K.D., Lambert, I.B., Lars, O., 2007. Sources , Fate , and Toxic Hazards of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ( PAHs ) at PAH- contaminated Sites 36, 475–485
- Luthy, R.G., 2004. Organic Contaminants in the Environment: Challenges for the Water/Environmental Engineering Community, in: *Water and Sustainable Development*. Washington, DC, pp. 40–93.
- Lützw, M., Kogel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Flessa, H., Guggenberger, G., Matzner, E., Marschner, B., 2007. SOM fractionation methods : Relevance to functional pools and to stabilization mechanisms 39, 2183–2207.
- Lützw, M., Kogel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Matzner, E., Guggenberger, G., Marschner, B., Flessa, H., 2006. Stabilization of organic matter in temperate soils : mechanisms and their relevance under different soil conditions ^ a review. *Eur. J. Soil Sci.* 57, 426–445.

-M-

- Ma, B., Wang, J., Xu, M., He, Y., Wang, H., Wu, L., Xu, J., 2012. Evaluation of dissipation gradients of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice rhizosphere utilizing a sequential extraction procedure. *Environ. Pollut.* 162, 413–421.
- 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.
- Mader, B.T., Uwe-Goss, K., Eisenreich, S.J., 1997. Sorption of nonionic, hydrophobic organic chemicals to mineral surfaces. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1079–1086.
- 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.
- Maguire, V., Svrcek, W.Y., Mehrotra, A.K., Razzaghi, M., 1995. A study of interactions between soil fractions and PAH compounds in thermal desorption of contaminated soils. *Can. J. Chem. Eng.* 73, 844–853.

- Maliszewska-Kordybach, 2005. Dissipation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in freshly contaminated soils – the effect of soil. *Water, Air Soil Pollut.* 168, 113–128.
- Manefield, M., Griffiths, R., McNamara, N.P., Sleep, D., Ostle, N., Whiteley, A., 2007. Insights into the fate of a  $^{13}\text{C}$  labelled phenol pulse for stable isotope probing (SIP) experiments. *J. Microbiol. Methods* 69, 340–344.
- Mangabeira, P.A., Gavrilov, K.L., De Almeida, A.A.F., Oliveira, A.H., Severo, M.I., Rosa, T.S., Da Costa Silva, D., Labejof, L., Escaig, F., Levi-Setti, R., Mielke, M.S., Loustalot, F.G., Galle, P., 2006. Chromium localization in plant tissues of *Lycopersicon esculentum* Mill using ICP-MS and ion microscopy (SIMS). *Appl. Surf. Sci.* 252, 3488–3501
- Mariotti, A., 1991. Le carbone 13 en abondance naturelle, traceur de la dynamique de la matière organique des sols et de l'évolution des paléoenvironnements continentaux. *Cah. Orstom, sér. Pédol.* XXVI, 299–313.
- McMahon, G., Glassner, B.J., Lechene, C.P., 2006. Quantitative imaging of cells with multi-isotope imaging mass spectrometry (MIMS)-Nanoautography with stable isotope tracers. *Appl. Surf. Sci.* 252, 6895–6906.
- McNear, D.H., 2013. The Rhizosphere - roots , soil and everything in between meeting the global challenge of sustainable food , fuel and fiber production *The Rhizosphere Defined.* *Nat. Educ.* 4, 1–15.
- Mechlińska, A., Gdaniec-Pietryka, M., Wolska, L., Namieśnik, J., 2009. Evolution of models for sorption of PAHs and PCBs on geosorbents. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28, 466–482.
- Menn, F.M., Applegate, B.M., Sayler, G.S., 1993. NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1938–1942.
- Menzie, C.A., Potocki, B.B., Santodonato, J., 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 26, 1278–1284.
- Mertz, C., Kleber, M., Jahn, R., 2005. Soil organic matter stabilization pathways in clay sub-fractions from a time series of fertilizer deprivation. *Org. Geochem.* 36, 1311–1322.
- Meyer, S., Steinhart, H., 2001. Fate of PAHs and hetero-PAHs during biodegradation in a model soil/compost-system: Formation of extractable metabolites. *Water. Air. Soil Pollut.* 132, 215–231.
- Migeon, A., Audinot, J.N., Eybe, T., Richaud, P., Damien, B., Migeon, H.N., Chalot, M., 2011. Cadmium and zinc localization by SIMS in leaves of *Populus deltoides* (cv. Lena) grown in a metal polluted soil. *Surf. Interface Anal.* 43, 367–369.
- Miya, R.K., Firestone, M.K., 2000. Phenanthrene-degrader community dynamics in rhizosphere soil from a common annual grass. *J. Environ. Qual.* 29, 584.

- Moni, C., Derrien, D., Hatton, P.J., Zeller, B., Kleber, M., 2012. Density fractions versus size separates: Does physical fractionation isolate functional soil compartments? *Biogeosciences* 9, 5181–5197.
- Monnier, G., Turc, L., Jeanson Luusinang, C., 1962. Une methode de fractionnement densimetrique par centrifugation des matieres organiques du sol.
- Monrozier, J., Ladd, J., Fitzpatrick, R., Foster, R., Raupach, M., 1991. Components and microbial biomass content of size fractions in soils of contrasting aggregation. *Geoderma* 49, 37–62.
- Monserie, M., Watteau, F., Villemin, G., Ouvrard, S., Morel, J.-L., 2009. Technosol genesis : identification of organo-mineral associations in a young Technosol derived from coking plant waste materials. *J. Soils Sediments* 9, 537–546.
- Moody, J.D., Freeman, J.P., Doerge, D.R., 2001. Degradation of Phenanthrene and Anthracene by Cell Suspensions of *Mycobacterium* sp . Strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1476–1483.
- 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.
- Moore, K.L., Lombi, E., Zhao, F.J., Grovenor, C.R.M., 2012. Elemental imaging at the nanoscale: NanoSIMS and complementary techniques for element localisation in plants. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 3263–3273.
- Moore, K.L., Schroder, M., Wu, Z., Martin, B.G., Hawes, C.R., McGrath, S.P., Hawkesford, M.J., Feng Ma, J., Zhao, F.J., Grovenor, C.R., 2011. High-resolution secondary ion mass spectrometry reveals the contrasting subcellular distribution of arsenic and silicon in rice roots. *Plant Physiol* 156, 913–924.
- Mueller, C.W., Kölbl, A., Hoeschen, C., Hillion, F., Heister, K., Herrmann, A.M., Kögel-Knabner, I., 2012. Submicron scale imaging of soil organic matter dynamics using NanoSIMS - From single particles to intact aggregates. *Org. Geochem.* 42, 1476–1488.
- Mueller, C.W., Weber, P.K., Kilburn, M.R., Hoeschen, C., Kleber, M., Pett-Ridge, J., 2013. Advances in the analysis of biogeochemical interfaces. Nanosims to investigate soil microenvironments. *Adv. Agron.* 121, 1–46.
- Mueller, K.E., Shann, J.R., 2006. PAH dissipation in spiked soil: impacts of bioavailability, microbial activity, and trees. *Chemosphere* 64, 1006–14.
- Müller, S., Totsche, K.U., Kögel-Knabner, I., 2007. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to mineral surfaces. *Eur. J. Soil Sci.* 58, 918–931.
- Murphy, E.M., Zachara, J.M., 1995. The role of sorbed humic substances on the distribution of organic and inorganic contaminants in groundwater. *Geoderma* 67, 103–124.
- Murphy, E.M., Zachara, J.M., Smith, S.C., Phillips, J.L., 1992. The sorption of humic acids to mineral surfaces and their role in contaminant binding 118, 413–423.

- Murphy, E.M., Zachara, J.M., Smith, S.C., Phillips, J.L., Wletsma, T.W., 1994. Hydrophobic organic compounds with mineral-bound humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1291–1299.
- Musat, N., Foster, R., Vagner, T., Adam, B., Kuypers, M.M.M., 2012. Detecting metabolic activities in single cells, with emphasis on nanoSIMS. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 486–511.
- Musat, N., Halm, H., Winterholler, B., Hoppe, P., Peduzzi, S., Hillion, F., Horreard, F., Amann, R., Jørgensen, B.B., Kuypers, M.M.M., 2008. A single-cell view on the ecophysiology of anaerobic phototrophic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 17861–6.
- Musat, N., Stryhanyuk, H., Bombach, P., Adrian, L., Audinot, J.N., Richnow, H.H., 2014. The effect of FISH and CARD-FISH on the isotopic composition of <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-labeled *Pseudomonas putida* cells measured by nanoSIMS. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 267–276.

-N-

- 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.
- Neilson, A.H., Allard, A., 2008. Chemistry of Organic Pollutants. *Environ. Ecol. Chem.* 1, 11.
- Ni, J., Luo, Y., Wei, R., Li, X., 2008. Distribution patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons among different organic carbon fractions of polluted agricultural soils. *Geoderma* 146, 277–282.
- Northcott, G.L., Jones, K.C., 2001. Partitioning, extractability, and formation of non extractable PAH residues in soil.2. Effects on compound dissolution behaviour. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1111–1117.
- 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
- Northcott, G.L., Jones, K.C., 2000. Experimental approaches and analytical techniques for determining organic compound bound residues in soil and sediment. *Environ. Pollut.* 108, 19–43.
- Norton, M., Firestone, M.K., 1996. N dynamics in the rhizosphere ponderosa of pinus *Soil Biol. Biochem.* 28, 351–362.

-O-

- Oades, J.M., 1989. An introduction to organic matter in mineral soils, in: *Minerals in Soil Environments*. Glen Osmond, South Australia.

- Oades, J.M., 1984. Soil organic matter and structural stability : mechanisms and implications for management. *Plant Soil* 337, 319–337.
- Oburger, E., Schmidt, H., 2015. New Methods To Unravel Rhizosphere Processes. *Trends Plant Sci.* xx, 1–13.
- Oehler, D., Robert, F., Mostefaoui, S., Meibom, A., Selo, M., McKay, D., 2007. Chemical mapping of proterozoic organic matter at submicron spatial resolution. *Astrobiology* 6, 838–50.
- Okere, U. V, Semple, K.T., 2012. Biodegradation of PAHs in “ Pristine ” soils from different climatic regions. *Bioremediation Biodegrad.* 1, 1–11.
- Oleszczuk, P., 2009. Bioresource Technology Application of three methods used for the evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) bioaccessibility for sewage sludge composting 100, 413–420.
- Ouvrard, S., Barnier, C., Bauda, P., Beguiristain, T., Biache, C., Bonnard, M., Caupert, C., Cébron, A., Cortet, J., Cotelle, S., Dazy, M., Faure, P., Masfaraud, J.F., Nahmani, J., Palais, F., Poupin, P., Raoult, N., Vasseur, P., Morel, J.L., Leyval, C., 2011. In situ assessment of phytotechnologies for multicontaminated soil management. *Int. J. Phytoremediation* 13 Suppl 1, 245–63.
- p-
- Pacholski, M.L., Winograd, N., 1999. Imaging with mass spectrometry. *Chem. Rev.* 99, 2977–3005.
- Pan, B., Xing, B.S., Liu, W.X., Tao, S., Lin, X.M., Zhang, X.M., Zhang, Y.X., Xiao, Y., Dai, H.C., Yuan, H.S., 2006. Distribution of sorbed phenanthrene and pyrene in different humic fractions of soils and importance of humin. *Environ. Pollut.* 143, 24–33.
- 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.
- Perminova, I., 1999. Relationships between structure and binding affinity of humic substances for polycyclic aromatic hydrocarbons: relevance of molecular descriptors. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3781–3787.
- Pernot, A., 2013. Réactivité des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans une terre de cokerie : influence de la répartition des contaminants et de l’introduction de matière organique fraîche.
- Pernot, A., Ouvrard, S., Leglize, P., Faure, P., 2013. Protective role of fine silts for PAH in a former industrial soil. *Environ. Pollut.* 179, 81–7.
- Peteranderl, R., Lechene, C., 2004. Measure of carbon and nitrogen stable isotope ratios in cultured cells. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15, 478–485.

- Pett-Ridge, J., Weber, P.K., 2012. Microbial systems biology, in: Ali Navid (Ed.), *Microbial Systems Biology*. pp. 279–306.
- Piatt, J.J., Backhus, D.A., Capel, P.D., Eisenreich, S.J., 1996. Temperature-dependent sorption of naphthalene, phenanthrene, and pyrene to low organic carbon aquifer sediments. *Environ. Sci. Technol.* 30, 751–760
- 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.
- Pignatello, J.J., 1998. Soil organic matter as a nanoporous sorbent of organic pollutants. *Adv. Colloid Interface Sci.* 76–77, 445–467.
- Pignatello, J.J., Xing, B., 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1–11.
- Pinyakong, O., 2004. Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4 238, 297–305.
- Pinyakong, O., Habe, H., Yoshida, T., Nojiri, H., Omori, T., 2003. Identification of three novel salicylate 1-hydroxylases involved in the phenanthrene degradation of *Sphingobium* sp. strain P2 301, 350–357.
- Piwoni, M.D., Keeley, J.W., 1990. Basic concepts of contaminant sorption at hazardous waste sites. *Gr. Water Issue Chap.* 2, 1–25.
- Popa, R., Weber, P.K., Pett-Ridge, J., Finzi, J. a, Fallon, S.J., Hutcheon, I.D., Nealson, K.H., Capone, D.G., 2007. Carbon and nitrogen fixation and metabolite exchange in and between individual cells of *Anabaena oscillarioides*. *ISME J.* 1, 354–360.
- Pothuluri, J. V, Cerniglia, C.E., 1994. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biol. Degrad. bioremediation toxic Chem.* 92–124.
- Preston, C.M., Schnitzer, M., Ripmeester, J.A., 1989. A spectroscopic and chemical investigation on the de-ashing of a humin. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53, 1442–1447.
- Printz, B., Guerriero, G., Sergeant, K., Audinot, J.-N., Guignard, C., Renaut, J., Lutts, S., Hausman, J.-F., 2016. Combining-omics to unravel the impact of copper nutrition on Alfalfa (*Medicago sativa*) stem metabolism. *Plant Cell Physiol.* 57, 407–22.
- Puglisi, E., Cappa, F., Fragoulis, G., Trevisan, M., Del Re, A.A.M., 2007. Bioavailability and degradation of phenanthrene in compost amended soils. *Chemosphere* 67, 548–556.
- Pumphrey, G.M., Hanson, B.T., Chandra, S., Madsen, E.L., 2009. Dynamic secondary ion mass spectrometry imaging of microbial populations utilizing <sup>13</sup>C-labelled substrates in pure culture and in soil. *Environ. Microbiol.* 11, 220–229.
- Pusino, A., Liu, W., Gessa, C., 1992. Influence of organic matter and its clay complexes on

metolachlor adsorption on soil. *Pestic. Sci.* 36, 283–286.

-Q-

Qiu, X., Shah, S.I., Kendall, E.W., Sorensen, D.L., Sims, R.C., Engelke, M.C., 1994. Grass enhanced bioremediation for clay soils contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons in: Anderson, T.A. and Coats, J. (Ed.), *Bioremediation through rhizosphere technology*, ACS symposium series. pp. 142–157.

Quintana, C., Bellefleur, S., Laval, J.Y., Guerquin-Kern, J.L., Wu, T.D., Avila, J., Ferrer, I., Arranz, R., Patiño, C., 2006. Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. *J. Struct. Biol.* 153, 42–54.

-R-

Reid, B.J., Jones, K.C., Semple, K.T., 2000. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments--a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environ. Pollut.* 108, 103–12.

Reilley, K.A., Banks, M.K., Schwab, A.P., 1996. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *J. Environ. Qual.* 25, 212.

Remusat, L., Hatton, P.-J., Nico, P.S., Zeller, B., Kleber, M., Derrien, D., 2012a. NanoSIMS study of organic matter associated with soil aggregates: advantages, limitations, and combination with STXM. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3943–9.

Remusat, L., Hatton, P., Nico, P.S., Zeller, B., Kleber, M., Derrien, D., 2012b. NanoSIMS study of organic matter associated with soil aggregates: advantages, limitations, and combination with STXM. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3943–3949.

Resnick, S., Lee, K., Gibson, D., 1996. *Pseudomonas* sp strain NCIB 9816. *J. Ind. Microbiol.* 4, 438–457.

Réveillé, V., Mansuy, L., Jardé, É., Garnier-Sillam, É., 2003. Characterisation of sewage sludge-derived organic matter: Lipids and humic acids. *Org. Geochem.* 34, 615–627.

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, 1603–8.

Richnow, H.H., Annweiler, E., Koning, M., Lüth, J.C., Stegmann, R., Garms, C., Francke, W., Michaelis, W., 2000. Tracing the transformation of labelled [1-<sup>13</sup>C]phenanthrene in a soil bioreactor. *Environ. Pollut.* 108, 91–101.

Richnow, H.H., Eschenbach, A., Mahro, B., Kästner, M., Annweiler, E., Seifert, R., Michaelis, W., 1999. Formation of nonextractable soil residues: a stable isotope approach. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3761–3767.

- Richnow, H.H., Eschenbach, A., Mahro, B., Seifert, R., Wehrung, P., Albrecht, P., Michaelis, W., 1998. The use of <sup>13</sup>C-labelled polycyclic aromatic hydrocarbons for the analysis of their transformation in soil. *Chemosphere* 36, 2211–2224.
- Richnow, H.H., Seifert, R., Hefter, J., Kästner, M., Mahro, B., Michaelis, W., 1994. Metabolites of xenobiotica and mineral oil constituents linked to macromolecular organic matter in polluted environments. *Org. Geochem.* 22, 671-681.
- Richnow, H.H., Seifert, R., Hefter, J., Link, M., Francke, W., Schaefer, G., Michaelis, W., 1997. Organic pollutants associated with macromolecular soil organic matter : Mode of binding. *Org. Geochem.* 26, 745–758.
- Richnow, H.H., Seifert, R., Kästner, M., Mahro, B., Horsfield, B., Tiedgen, U., Böhm, S., Michaelis, W., 1995. Rapid screening of PAH-residues in bioremediated soils. *Chemosphere* 31, 3991–3999.
- Robbat, A., Liu, T., Abraham, B.M., 1992. On-site detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soils by thermal desorption gas chromatography. *Mass Spectrometry* 23, 1477–1483.
- Römer, W., Wu, T. Di, Duchambon, P., Amessou, M., Carrez, D., Johannes, L., Guerquin-Kern, J.L., 2006. Sub-cellular localisation of a <sup>15</sup>N-labelled peptide vector using NanoSIMS imaging. *Appl. Surf. Sci.* 252, 6925–6930.
- Rugh, C.L., Susilawati, E., Kravchenko, A.N., Thomas, J.C., 2005. Biodegrader metabolic expansion during polyaromatic hydrocarbons. *Verlag der Zeitschrift für Naturforsch.* 60, 331–339.
- §-
- Sabaté, J., Viñas, M., Solanas, A.M., 2006. Bioavailability assessment and environmental fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in biostimulated creosote-contaminated soil. *Chemosphere* 63, 1648–1659.
- Saiz-Jimenez, C., 1994. Analytical pyrolysis of humic substances: Pitfalls, limitations, and possible solutions. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1773–1780.
- Salati, S., Adani, F., Cosentino, C., Torri, G., 2008. Studying soil organic matter using <sup>13</sup>C CP-MAS NMR: the effect of soil chemical pre-treatments on spectra quality and representativity. *Chemosphere* 70, 2092–8.
- Salloum, M.J., Chefetz, B., Hatcher, P.G., 2002. Phenanthrene sorption by aliphatic-rich natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1953–1958.
- Schlanges, I., Meyer, D., Palm, W.-U., Ruck, W., 2008. Identification, quantification and distribution of pac-metabolites, heterocyclic pac and substituted pac in groundwater samples of tar-contaminated sites from Germany. *Polycycl. Aromat. Compd.* 28, 320–
- Schmidt, M.W.I., Gleixner, G., 2005. Carbon and nitrogen isotope composition of bulk soils,

- particle-size fractions and organic material after treatment with hydrofluoric acid. *Eur. J. Soil Sci.* 56, 407–416.
- Schmidt, M.W.I., Knicker, H., Hatcher, P.G., Kogel-Knabner, I., 1997. Improvement of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N CPMAS NMR spectra of bulk soils, particle size fractions and organic material by treatment with 10 % hydrofluoric acid. *Eur. J. Soil Sci.* 48, 319–328.
- Schmidt, M.W.I., Noack, A.G., 2000. Black carbon in soils and sediments? Analysis, distribution, implications, and current challenges. *Global Biogeochem. Cycles* 14, 777–793.
- Schmidt, M.W.I., Rumpel, C., Kögel-Knabner, I., 1999. Evaluation of an ultrasonic dispersion procedure to isolate primary organomineral complexes from soils. *Eur. J. Soil Sci.* 50, 87–94.
- Schmidt, M.W.I., Torn, M.S., Abiven, S., Dittmar, T., Guggenberger, G., Janssens, I.A., 2012. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* 478, 49–56.
- Schnitzer, M., Khan, S., 1978. *Soil Organic Matter*, 1<sup>ère</sup> ed. Elsevier B.V.
- Schnitzer, M., Schulten, H., 1995. Analysis of Organic Matter in Soil Extracts and Whole Soils by. *Adv. Agron.* 55, 167–198.
- Schöning, I., Kögel-Knabner, I., 2006. Chemical composition of young and old carbon pools throughout Cambisol and Luvisol profiles under forests 38, 2411–2424.
- Schulze, D.G., 2006. Clay minerals. *Clay Miner.* 30, 246–254.
- Schurig, C., Mueller, C.W., Hoschen, C., Prager, A., Kothe, E., Beck, H., Miltner, A., Kästner, M., 2014. Methods for visualising active microbial benzene degraders in in situ microcosms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 957–968.
- Schwab, A.P., Banks, M.K., 1994. Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root zone. *Am. Chem. Soc. Chap.* 12, 132-141
- Semple, K.T., Doick, K.J., Wick, L.Y., Harms, H., 2007. Microbial interactions with organic contaminants in soil: definitions, processes and measurement. *Environ. Pollut.* 150, 166–76.
- Semple, K.T., Morriss, A., Paton, G.I., 2003. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils : fundamental concepts and techniques for analysis. *Eur. J. Soil Sci.* 54, 809–818.
- Shang, C., Tiessen, H., 1998. Organic matter stabilization in two semiarid tropical soils: size, density, and magnetic separations. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62, 1247.
- Shuttleworth, K.A.Y.L., Cerniglia, C.E., 1995. Environmental aspects of PAH. *Biodegradation* 54, 291–302.
- Siméon, N., Mercier, G., Ouvrard, S., Guedon, E., Blais, J.-F., Goergen, J.-L., Leyval, C.,

- Cébron, A., 2008. Décontamination de sols pollués par les hydrocarbures aromatiques polycycliques par biodégradation en présence de substrats organiques supplémentaires. *J. Environ. Eng. Sci.* 7, 467–479.
- Simonich, S.L., Hites, R.A., 1995. Organic Pollutant Accumulation in Vegetation Partners. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2905–2914.
- Simpson, M.J., Chefetz, B., Hatcher, P.G., 2003. Phenanthrene sorption to structurally modified humic acids. *J. Environ. Qual.* 32, 1750–1758.
- Simpson, M.J., Johnson, P.C.E., 2006. Identification of mobile aliphatic sorptive domains in soil humin by solid-state  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 52–57.
- Sims, R.C., Overcash, M.R., 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Residue Rev.* 88, 157.
- Skjemstad, J.O., Catchpoole, V.R., Lefeuvre, R.P., 1994. Carbon dynamics in vertisols under several crops as assessed by natural abundance  $^{13}\text{C}$ . *Soil Res.* 32, 311–321.
- Slodzian, G., Daigne, B., Girard, F., Boust, F., Hillion, F., 1992. Scanning secondary ion analytical microscopy with parallel detection. *Biol. Cell* 74, 43–50.
- Slodzian, G., Daigne, B., Girard, F., Boust, F., Hillion, F., 1991. A high-resolution scanning ion microscope with parallel detection of secondary ions. *Proc 8th Int Conf Second. Ion Mass Spectrom.* 1991, SIMS VIII 169–178.
- Smernik, R.J., Baldock, J.A., 2005. Solid-state N NMR analysis of highly N-enriched plant materials. *Plant Soil* 275, 271–283.
- Smernik, R.J., Kookana, R.S., Skjemstad, J.O., 2006. NMR characterization of  $^{13}\text{C}$ -benzene sorbed to natural and prepared charcoals. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1764–1769
- 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, 519–25.
- Smith, M.J., Flowers, T.H., Duncan, H.J., Saito, H., 2011. Study of PAH dissipation and phytoremediation in soils: comparing freshly spiked with weathered soil from a former coking works. *J. Hazard. Mater.* 192, 1219–1225.
- Smith, M.J., Flowers, T.H., Duncan, H.J., Saito, H., 2011. Study of PAH dissipation and phytoremediation in soils: comparing freshly spiked with weathered soil from a former coking works. *J. Hazard. Mater.* 192, 1219–25.
- Smith, M.J., Flowers, T.H., Duncan, H.J., Saito, H., 2011. Study of PAH dissipation and phytoremediation in soils: comparing freshly spiked with weathered soil from a former coking works. *J. Hazard. Mater.* 192, 1219–1225.
- Sollins, P., Homann, P., Caldwell, B. a., 1996. Stabilization and destabilization of soil organic

- matter. *Geoderma* 74, 65–105.
- Sollins, P., Swanston, C., Kleber, M., Filley, T., Kramer, M., Crow, S., Caldwell, B.A., Lajtha, K., Bowden, R., 2006. Organic C and N stabilization in a forest soil : Evidence from sequential density fractionation. *Soil Biol. Biochem.* 38, 3313–3324.
- Sollins, P., Swanston, C., Kleber, M., Filley, T., Kramer, M., Crow, S., Caldwell, B., Lajtha, K., Bowden, R., 2005. Organic C and N stabilization in a forest soil : evidence from sequential density fractionation. *Soil Biol. Biochem.* 38, 3313–3324
- Song, Y.F., Jing, X., Fleischmann, S., Wilke, B.M., 2002. Comparative study of extraction methods for the determination of PAHs from contaminated soils and sediments. *Chemosphere* 48, 993–1001.
- Speranza, M., Ruiz-dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Gutiérrez, A., Río, J.C., 2005. Biodegradation of lignocelluloses : microbial , chemical , and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.* 8, 195–204.
- Sposito, G., 1989. Surface reactions in natural aqueous colloidal systems. *Chimia.* 43, 169–176.
- Stauffer, B., Macintyre, G., 1986. Sorption of low polarity organic compounds on oxide mineral and aquifer material. *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 949–955.
- Stengel, P., Gelin, S., 1998. *Sol : interface fragile*, INRA Editi. ed.
- Stokes, J.D., Wilkinson, A., Reid, B.J., Jones, K.C., Semple, K.T., 2005. Prediction of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in contaminated soils using an aqueous Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin Extraction Technique. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1325.
- Storey, S., Ashaari, M.M., McCabe, G., Harty, M., Dempsey, R., Doyle, O., Clipson, N., 2014. Microbial community structure during fluoranthene degradation in the presence of plants. *J. Appl. Microbiol.* 117, 74–84.
- Swindell, L., Reid, B.J., 2006. Comparison of selected non-exhaustive extraction techniques to assess PAH availability in dissimilar soils. *Chemosphere* 62, 1126–34.

-T-

- Tartivel, R., Tatin, R., Delhaye, T., Maupas, A., Gendron, A., Gautier, S., Lavastre, O., 2012. Visualization and localization of bromotoluene distribution in *Hedera helix* using NanoSIMS. *Chemosphere* 89, 805–809.
- Tejeda-Agredano, M., Gallego, S., Vila, J., Grifoll, M., Cantos, M., 2013. Influence of the sunflower rhizosphere on the biodegradation of PAHs in soil. *Soil Biol. Biochem.* 57, 830–840.
- Theng, B.K.G., Churchmann, G.J., Newman, R.H., 1986. The occurrence of interlayer clay-

organic complexes in the new zealand soils. *Soil Sci.* 142.

Tisdall, J.M., Oades, J.M., Science, S., Agricultural, W., 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils 141–163.

Towell, M.G., Browne, L. a, Paton, G.I., Semple, K.T., 2011. Impact of carbon nanomaterials on the behaviour of <sup>14</sup>C-phenanthrene and <sup>14</sup>C-benzo-[a] pyrene in soil. *Environ. Pollut.* 159, 706–15.

-U-

Usman, M., Faure, P., Ruby, C., Hanna, K., 2012. Remediation of PAH-contaminated soils by magnetite catalyzed Fenton-like oxidation. *Appl. Catal. B Environ.* 117–118, 10–17.

Uyttebroek, M., Breugelmans, P., Janssen, M., Wattiau, P., Joffe, B., Karlson, U., Jj, O., Bastiaens, L., 2006. Distribution of the Mycobacterium community and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) among different size fractions of a long-term. *Environmental Microbiology.* 8, 836-847.

Uzgiris, E.E., Edelstein, W.A., Philipp, H.R., Timothy Iben, I.E., 1995. Complex thermal desorption of PCBs from soil. *Chemosphere* 30, 377–387.

Vencura, V., Hovadík, A., 1965. Root exudates of plants : II . composition of root exudates of some vegetables. *Plant Soil* 22, 21–32.

-V-

Vermeer, A.W.P., Koopal, L.K., 1998. Adsorption of humic acids to mineral particles 2. Polydispersity effects with polyelectrolyte adsorption 7463, 4210–4216.

Vermeer, A.W.P., Riemsdijk, W.H. Van, Koopal, L.K., 1998. Adsorption of humic acid to mineral particles . 1 . Specific 7463, 2810–2819.

Verstraete, W., Devliegher, W., 1997. Formation of non-bioavailable organic residues in soil: Perspectives for site remediation. *Biodegradation* 7, 471–485.

Vidal, A., Remusat, L., Watteau, F., Derenne, S., Quenea, K., 2016. Incorporation of <sup>13</sup>C labelled shoot residues in *Lumbricus terrestris* casts: A combination of transmission electron microscopy and nanoscale secondary ion mass spectrometry. *Soil Biol. Biochem.* 93, 8–16.

Vogel, C., Mueller, C.W., Höschen, C., Buegger, F., Heister, K., Schulz, S., Schloter, M., Kögel-Knabner, I., 2014. Submicron structures provide preferential spots for carbon and nitrogen sequestration in soils. *Nat. Commun.* 5, 2947.

## -W-

- Walter J Weber, Huang, W., Yu, H., 1998. Hysteresis in the sorption and desorption of hydrophobic organic contaminants by soils and sediments 2 . Effects of soil organic matter heterogeneity. *J. Contam. Hydrol.* 31, 149–165.
- Walton, J.D., 1994. Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* 104, 1113–1118.
- Wang, K., Xing, B., 2005. Chemical extractions affect the structure and phenanthrene sorption of soil humin. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8333–8340.
- Wang, W., Meng, B., Lu, X., Liu, Y., Tao, S., 2007. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. *Anal. Chim. Acta* 602, 211–222.
- Wattel-koekkoek, E.J.W., Buurman, P., 2004. Mean residence time of kaolinite and smectite-bound organic matter in Mozambiquan soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 68, 154–161.
- Weber, W.J., McGinley, P.M., Katz, L.E., 1992. A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 1. Conceptual basis and equilibrium assessments. *Environ. Sci. Technol.* 26, 1955–1962.
- Wei, S., Pan, S., 2010. Phytoremediation for soils contaminated by phenanthrene and pyrene with multiple plant species. *J. Soils Sediments* 10, 886–894.
- Wershaw, R.L., 2004. Evaluation of conceptual models of natural organic matter (humus) from a consideration of the chemical and biochemical processes of humification 45.
- Wilcke, W., Krauss, M., Amelung, W., 2002. Carbon isotope signature of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): evidence for different sources in tropical and temperate environments 36, 3530–3535.
- 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.
- Wild, S.R., Jones, K.C., 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environ. Pollut.* 88, 91.
- Wild, S.R., Jones, K.C., Johnston, A.E., 1992. The polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) content of herbage from a long-term grassland experiment. *Atmos. Environ. Part A, Gen. Top.* 26, 1299–1307.
- Wilson, M.A., Vassallo, A.M., Perdue, E.M., Reuter, J.H., 1987. A compositional and solid-state nuclear magnetic resonance study of humic and fulvic acid fractions of soil organic matter. *Anal. Chem.* 59, 551–558.
- Wilson, S.C., Jones, K.C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ. Pollut.* 81, 229–249.

Wischmann, H., Steinhart, H., 1997. The formation of PAH oxidation products in soils and soil/compost mixtures. *Chemosphere* 35, 1681–1698.

Wischmann, H., Steinhart, H., Hupe, K., Montresori, G., Stegmann, R., 1996. Degradation of selected PAHs in soil/compost and identification of intermediates. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 64, 247–255.

-X-

Xiao, D., Pan, B., Wu, M., Liu, Y., Zhang, D., Peng, H., 2012. Sorption comparison between phenanthrene and its degradation intermediates, 9,10-phenanthrenequinone and 9-phenanthrol in soils/sediments. *Chemosphere* 86, 183–9.

Xing, B., 2001. Sorption of naphthalene and phenanthrene by soil humic acids. *Environ. Pollut.* 111, 303–9.

-Y-

Yang, Y., Zhang, N., Xue, M., Tao, S., 2010. Impact of soil organic matter on the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons ( PAHs ) in soils. *Environ. Pollut.* 158, 2170–2174.

Yoshitomi, K.J., Shann, J.R., 2001. Corn (*Zea mays L*) root exudates and their impact on 14 C-pyrene mineralization 33, 1769–1776.

-Z-

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.

Zhou, X.B., Cébron, A., Béguiristain, T., Leyval, C., 2009. *Chemosphere* Water and phosphorus content affect PAH dissipation in spiked soil planted with mycorrhizal alfalfa and tall fescue. *Chemosphere* 77, 709–713.



# Annexes



**Annexe du Chapitre II**

**Estimation des temps de sédimentation pour le fractionnement densimétrique.** Les temps de sédimentation ( $T_s$ ) dépendent de la vitesse de sédimentation ( $V_s$ ), et également de la hauteur du liquide dans le tube à centrifugation. Celle-ci est exprimée selon la hauteur de sa verticale ( $H_{vt}$ ) puisque le tube est en position inclinée dans le rotor (**Eq.1**)

$$T_s = H_{vt} / V_s \quad \text{Éq. 6}$$

Où  $H_{vt}$  est exprimé en cm,  $V_s$  est en  $\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$  et  $T_s$  est donné en min.

La loi de Stokes (**Eq.2**) permet d'exprimer la vitesse de sédimentation en fonction du diamètre des particules ( $D$ ) et des caractéristiques du milieu fluide :

$$V_s = D^2 \times (d_p - d_f) \times g_c / (18\nu) \quad \text{Éq. 7}$$

Où  $d_p$  correspond à la densité de la particule ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ),  $d_f$  à la densité du fluide ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ),  $g_c$  se réfère à la puissance de centrifugation ( $\text{cm}\cdot\text{s}^{-2}$ ) et  $\nu$  à la viscosité du fluide ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Le diamètre des particules  $D$  est exprimé en cm et  $V_s$  en  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ .

La puissance de centrifugation ( $g_c$ ) est obtenue à partir de l'équation suivante :

$$g_c = w^2 \times r = (2 \times \pi / 60 \times \text{rpm})^2 \times r \quad \text{Éq. 8}$$

Où  $w$  exprime la vitesse angulaire ( $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $r$  le rayon du rotor (cm) et rpm correspond au nombre de rotations par minutes du rotor.

La vitesse de centrifugation étant fixée à 10000 rpm, la puissance de centrifugation est constante à  $14460747 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-2}$ . Les facteurs faisant varier la vitesse, et donc le temps de sédimentation, sont le diamètre des particules et la viscosité du fluide qui est fonction de la densité du fluide (**Figure 1**).

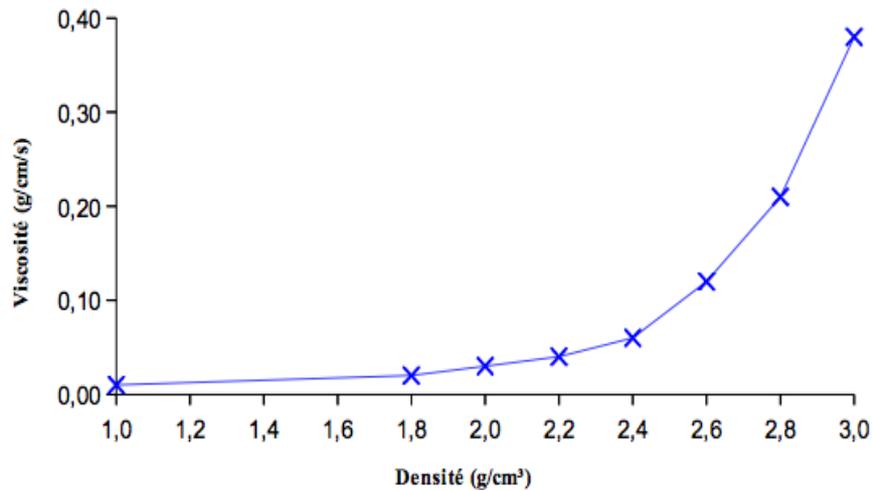


Figure-Annexe II.1. Relation entre la densité et la viscosité du SPT (TC-Tungsten Compounds, 2013)

A partir des différentes équations, pour chacune des densités utilisées et pour chaque taille de particules, la vitesse et le temps de sédimentation ont été calculés. Les temps de centrifugation ont été estimés pour chaque densité de solution de métatungstate de sodium et sont donnés. Les temps de sédimentation sont d'autant plus élevés que la taille des particules est réduite et une forte densité de fluide est un frein au dépôt. En conséquence, pour les séparations à faible densité de fluide (1 et 1.9), des centrifugations de 70 minutes ont permis de faire sédimenter les particules fines. Une centrifugation trop longue aurait pu rendre le culot plus complexe à casser pour les séparations suivantes engendrant des pertes de matières, déjà importantes lors de ce type de procédure.

Pour les densités 2.6 (ou 2.7) et 2.9, afin d'éviter des temps de centrifugation considérables non réalisables en pratique, des temps de 110 min et 210 min ont été choisis respectivement. Ces derniers ne permettent cependant pas de faire sédimenter des particules aussi fines que pour les deux premières séparations.

### **Annexe II.1.** Estimation des temps de sédimentation pour le fractionnement densimétrique

## Principe

Quantifier la microflore totale et dégradant les HAPs en plaques de microtitration de 96 puits en déterminant le Nombre le Plus Probable (NPP) à l'aide des grilles standard de Mac Grady.

### 1. Préparation de l'inoculum bactérien par suspension-dilution

**1g d'échantillon de sol** est pesé et mis à agiter avec **10 mL de chlorure de sodium (NaCl) à 0,85 % et 6 g de billes de verre d'1 mm de diamètre** (préalablement stérilisées) dans un tube Falcon stérile.

Une série de dilutions en cascade est ensuite réalisée à partir de la suspension bactérienne  $10^0$ .

### 2. Préparation du mélange de HAPs.

Le mélange est composé **de 9 mg d'anthracène, 9 mg de fluorène, 9 mg de fluoranthène et 90 mg de phénanthrène**. Les quatre HAPs ont été pesés dans un flacon en verre, puis 8 mL d'hexane ont été ajoutés. Pour que les HAPs soient bien dissous dans le solvant, on passe le flacon en verre au bain-marie à 40°C pendant quelques minutes. Lorsque la dissolution est complète, le flacon en verre est entouré de papier aluminium (pour éviter la photodégradation) et conservé à 4°C jusqu'à son utilisation.

### 3. Préparation des milieux

#### **a. LB pour la microflore totale.**

Pour préparer 1L de milieu LB (Luna & Bertanil) sont pesés dans une bouteille shot :

- ✓ 10g de peptone
- ✓ 5g de yeast extract
- ✓ 5g de NaCl

Auquel est ajouté 1L d'eau déminéralisée (ED) à l'aide d'une éprouvette graduée.

Une fois le milieu fini, il est autoclavé (120°C, 1 bar, 20 min.)

#### **b. Bushnell-Haas (BH) pour la microflore dégradante.**

Pour préparer 1L de milieu Bushnell Haas sont pesés dans une bouteille shot :

- ✓ 3,27 g de BH (DIFCO)
- ✓ 8,5 g de NaCl

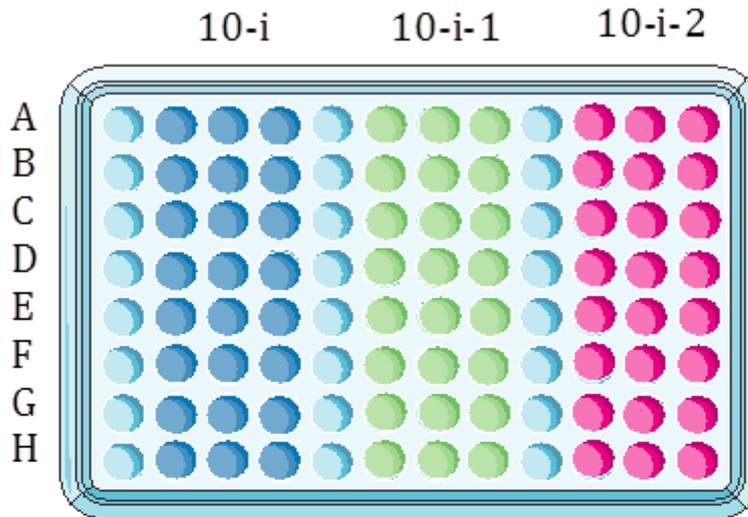
+ Ajout d'1L d'ED à l'aide d'une éprouvette graduée

Lorsque le milieu est prêt, **le pH est ajusté à 7,4**, puis il est autoclavé (120°C, 1 bar, 20 min.).

### a. Solution saline

Préparer du chlorure de sodium à 8,5 g/L. Autoclaver à 120°C sous 1 bar pendant 20 min.

### 1. Préparation des microplaques



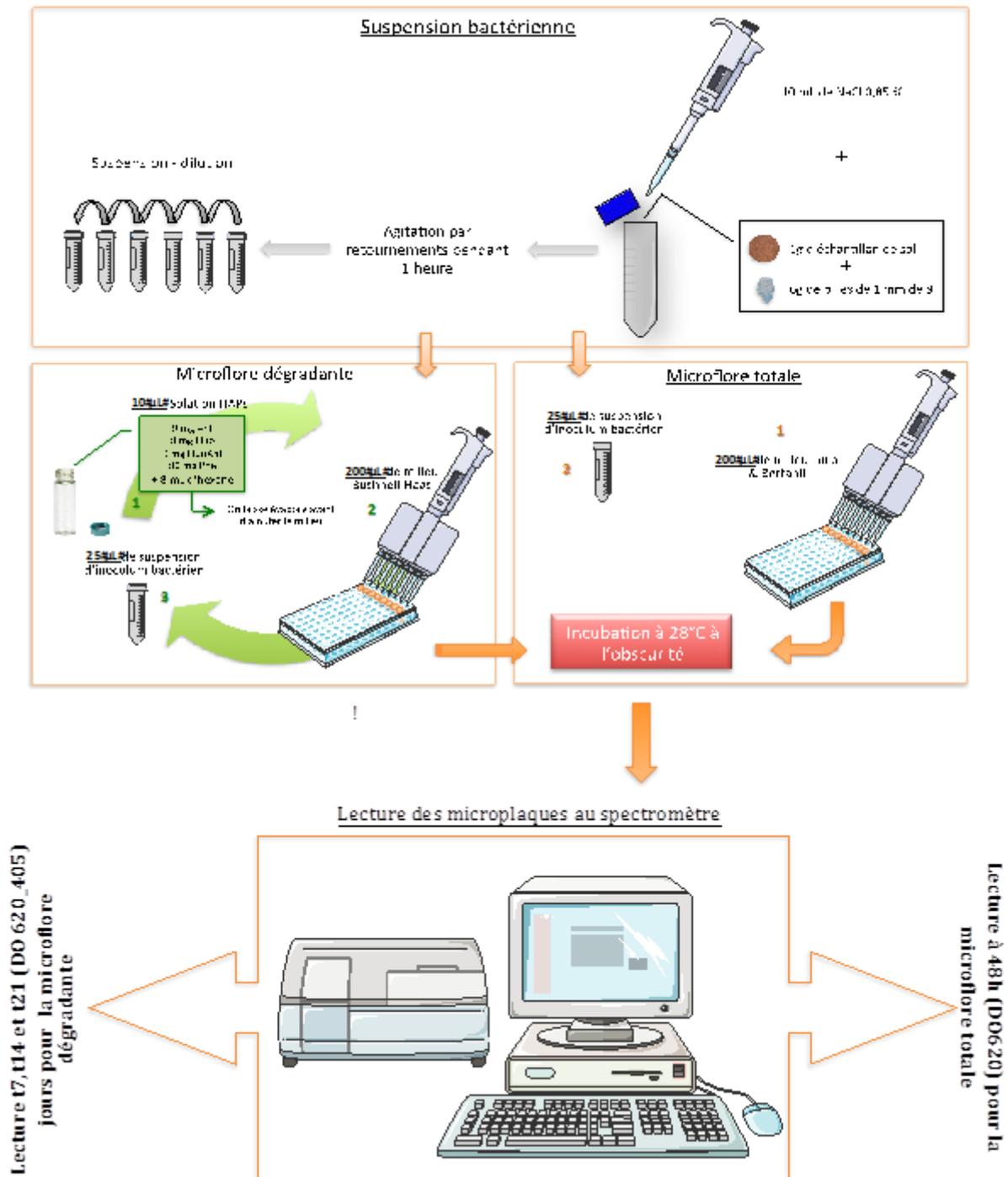
### a. Microflore totale

**25  $\mu$ L de suspension d'inoculum bactérien** sont inoculés dans **200 $\mu$ L de milieu LB** pour chaque puits. Puis les microplaques sont mises à incuber à l'obscurité à 28°C. Les microplaques 96 puits sont laissées pendant une semaine est une mesure de DO620 est faite au bout de 48h.

### b. Microflore dégradante

**10  $\mu$ L du mélange HAPs** sont déposés dans chacun des 96 puits. Les plaques sont laissées ouvertes pour permettre au solvant de s'évaporer en totalité. Le solvant évaporé, du **milieu BH** est introduit à hauteur de **200 $\mu$ L** puis chacun des puits estensemencé par **25  $\mu$ L de suspension d'inoculum bactérien**. Les microplaques sont mises à incuber pendant deux semaines à l'obscurité sous 28°C. Une mesure de la densité optique (DO) à 405 et à 620 nm (DO405-DO620) est réalisée au bout de 15 jours.

## Annexes



Annexe II 2. Protocole NPP (Nombre le Plus Probable) détaillé



## Annexes

### Annexe du Chapitre V

**Annexe V-1.** Teneurs en  $C_{total}$ , N,  $\delta^{13}C$ ,  $^{13}C_{conc}$  (moyenne  $\pm$  SD) dans les différentes fractions densimétriques ( $mg.g^{-1}$  fraction,  $\mu g.g^{-1}$  fraction pour la  $^{13}C_{conc}$  et  $mg.g^{-1}$  sol ou  $\mu g.g^{-1}$  sol pour la  $^{13}C_{conc}$ ) et dans le sol non fractionné ( $mg.g^{-1}$  sol ou  $\mu g.g^{-1}$  sol pour la  $^{13}C_{conc}$ ), rapport C/N et valeurs de surface spécifique ( $m^2.g^{-1}$  sol) du sol non fractionné à T0 et des fractions et répartition en masse ( $\%m_{fraction}$ ), et en  $^{13}C$  ( $\%^{13}C_{fraction}$ ) dans chaque fraction. Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre les fractions de sol (a, b) et entre les temps (a, A) ( $p < 0,05$ ).

			$C_{total}$	$N_{total}$	$\delta^{13}C$	$^{13}C_{conc}$	Surface spécifique	$m_{fraction}$	$C_{total}$	$N_{total}$	C/N	$^{13}C_{conc}$	$^{13}C_{fraction}$
			$mg.g^{-1}$ fraction	$\%$	$\%$	$\mu g.g^{-1}$ fraction	$m^2.g^{-1}$	$\%$	$mg.g^{-1}$ sol			$\mu g.g^{-1}$ sol	$\%$
SOL NON FRACTIONNÉ	Planté	T0	/				28,1 $\pm$ 3,0	/	23,5 $\pm$ 0,7	2,1 $\pm$ 0,3	11,2 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	22,8 $\pm$ 1,3	/
		T14	/						23,1 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,3	11,0 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	12,9 $\pm$ 1	
FRACTIONS DENSIMÉTRIQUES	<1	T0	53,5 $\pm$ 6,9	4,6 $\pm$ 0,1	7,0 $\pm$ 2,8	18,7 $\pm$ 4	/	0,4 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0 $\pm$ 0	11,7 $\pm$ 1,3	0,1 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,1
		T14	69,0 $\pm$ 8,4	5,2 $\pm$ 0,2	295,1 $\pm$ 55,6	244,7 $\pm$ 68,5	/	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0 $\pm$ 0	13,2 $\pm$ 1,0	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	7,2 $\pm$ 0,5
	1-1.9	T0	351,7 $\pm$ 4,8	12,2 $\pm$ 0,1	40,8 $\pm$ 0,4	260,5 $\pm$ 5,6	7,1 $\pm$ 1,7	1,4 $\pm$ 0,0	4,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	28,8 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	3,6 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	16,2 $\pm$ 0,6
		T14	344,2 $\pm$ 5,1	12,2 $\pm$ 0,4	-1,7 $\pm$ 5,3	94,7 $\pm$ 19	/	1,4 $\pm$ 0,1	4,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	28,3 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	1,4 $\pm$ 0,3 <sup>B</sup>	11,6 $\pm$ 2,4
	1.9-2.7	T0	16,9 $\pm$ 1,3	1,9 $\pm$ 0,2	25,6 $\pm$ 1,7	9,4 $\pm$ 1	27,6 $\pm$ 3,0	72,7 $\pm$ 1,3	12,3 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	1,4 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	8,8 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	6,9 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>	28,3 $\pm$ 3,7
		T14	19,8 $\pm$ 3,5	2,3 $\pm$ 0,4	14,9 $\pm$ 3,2	8,7 $\pm$ 2	/	76,1 $\pm$ 1,2	15,0 $\pm$ 2,4 <sup>b</sup>	1,7 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	8,8 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>	6,6 $\pm$ 1,4 <sup>c</sup>	48,5 $\pm$ 10,7
>2.7	T0	12,0 $\pm$ 0,8	1,2 $\pm$ 0,1	24,6 $\pm$ 3	6,5 $\pm$ 0,7	20,5 $\pm$ 4,4	16,2 $\pm$ 1	1,9 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	0,2 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	10,0 $\pm$ 1,1 <sup>ac</sup>	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup>	4,7 $\pm$ 0,4	
	T14	12,9 $\pm$ 1,5	1,3 $\pm$ 0,2	13,3 $\pm$ 3,9	5,4 $\pm$ 0,2	/	16,2 $\pm$ 5,2	2,1 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>	0,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	9,9 $\pm$ 0,4 <sup>ac</sup>	0,9 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup>	5,2 $\pm$ 1,9	



Annexes

Annexes du Chapitre VI

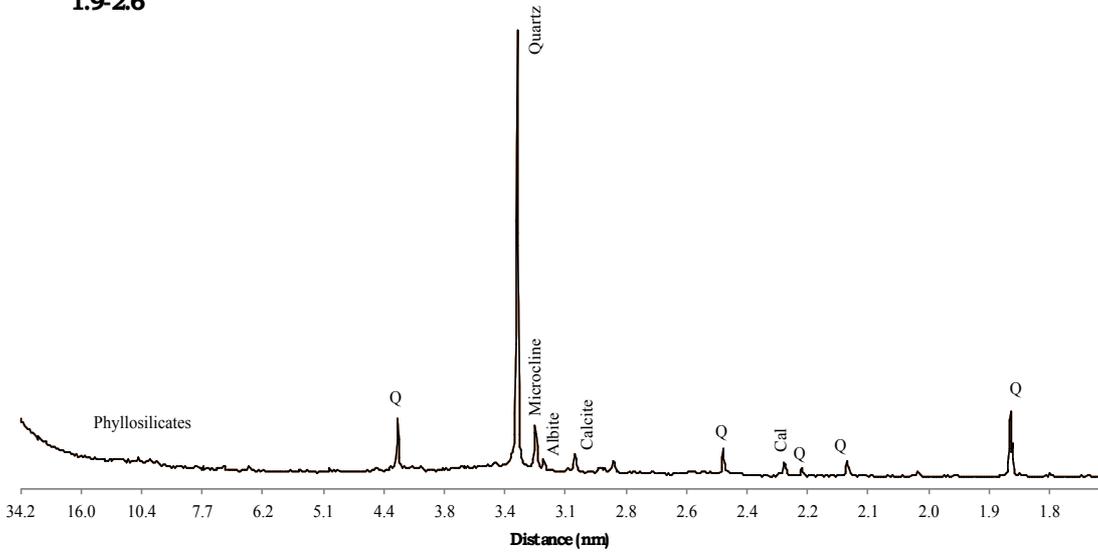
**Annexe VI 1.** Teneurs en C<sub>total</sub>, N, COT et en HAP totaux (moyenne ± SD) dans les différentes fractions densimétriques (mg.g<sup>-1</sup> fraction et mg.g<sup>-1</sup> sol sec ou mg.kg<sup>-1</sup> sol pour les 16HAP) et dans le sol non fractionné (mg.g<sup>-1</sup> sol ou mg.kg<sup>-1</sup> sol pour les HAP), rapport C/N et valeurs de surface spécifique (m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> sol) des sols non fractionnés et des fractions et répartition en masse (%m<sub>fraction</sub>), en C (%C<sub>fraction</sub>), en N (%N<sub>fraction</sub>), en COT (%COT<sub>fraction</sub>) et HAP (%HAP<sub>fraction</sub>) dans chaque fraction. Les valeurs sont données pour les deux sols (HOM et HOM<sub>+HAP</sub>). Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre les fractions de sol (a, b) et entre les sols (a,A) (p<0,05).

		C <sub>total</sub>	N <sub>Ctotal</sub>	N <sub>COT</sub>	COT	16 HAP	m <sub>fraction</sub> (%)	C <sub>total</sub>	N <sub>Ctotal</sub>	N <sub>COT</sub>	COT	C/N	16 HAP	Surface spécifique	C <sub>fraction</sub>	N <sub>fraction</sub>	COT <sub>fraction</sub>	HAP <sub>fraction</sub>	
		mg.g <sup>-1</sup> fraction						mg.g <sup>-1</sup> sol sec						mg.kg <sup>-1</sup> sol sec	m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup>	%			
SOL NON FRACTIONNÉ	TO	HOM						216,3 ± 46,9 <sup>a</sup>	3,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	86,8 ± 11,9 <sup>a</sup>	42,7 ± 5,1	727,4 ± 33,4 <sup>a</sup>	4,6 ± 1,1					
		HOM <sub>+HAP</sub>			/			272,9 ± 13,8 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	134,8 ± 10,1 <sup>a</sup>	61,6 ± 17,7	940,8 ± 127,2 <sup>A</sup>	/			/		
	T15	HOM						205,8 ± 36,7 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	98,9 ± 14,3 <sup>a</sup>	43,5 ± 4,5	810,0 ± 76,5 <sup>a</sup>	/					
		HOM <sub>+HAP</sub>						256,4 ± 25 <sup>a</sup>	4 ± 0,6 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	176,6 ± 119,7 <sup>a</sup>	71,5 ± 22,4	1048,7 ± 38,7 <sup>A</sup>	/					
FRACTIONS DENSIMÉTRIQUES	<1	HOM	283,0 ± 0	23,5 ± 0	20,6 ± 0	229,9 ± 0	0,04 ± 0	0,2 ± 0	0,5 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	0,4 ± 0	11,2 ± 0	40,2 ± 0	/	0,3 ± 0	1,4 ± 0,2	0,4 ± 0	/
		HOM <sub>+HAP</sub>	261,0 ± 0	17,2 ± 0	/	/	0,00 ± 0	0,2 ± 0	0,7 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,7 ± 0	15,2 ± 0	2,2 ± 0	/	0,3 ± 0	1,1 ± 0	0,4 ± 0	0,2 ± 0
	1-1,9	HOM	705,4 ± 220,8	11,0 ± 3,6	12,5 ± 1	629,0 ± 33,5	3,2 ± 0,2	20,4 ± 2,8	148,1 ± 62,1 <sup>b</sup>	2,3 ± 1 <sup>b</sup>	2,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	131,2 ± 18,4 <sup>b</sup>	50,8 ± 5,1 <sup>a</sup>	649,2 ± 58,4 <sup>b</sup>	3,0 ± 2,1	71,9 ± 30,2	70,4 ± 31,4	132,7 ± 16,4	80,1 ± 7,2
		HOM <sub>+HAP</sub>	641,9 ± 81,3	10,7 ± 1,4	11,8 ± 0,4	630,0 ± 45,4	3,5 ± 0,4	19,3 ± 1,7	124 ± 18,6 <sup>b</sup>	2,1 ± 0,4 <sup>b</sup>	2,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	122,3 ± 11,6 <sup>b</sup>	53,2 ± 2,9 <sup>a</sup>	669,1 ± 115,2 <sup>b</sup>	/	48,4 ± 7,3	51,9 ± 8,8	69,2 ± 7,6	63,8 ± 11
	1,9-2,6	HOM	172,6 ± 39,3	,02 ± 0,4	1,7 ± 0,2	86,2 ± 16,9	0,5 ± 0,1	24,5 ± 0,6	42,4 ± 9,9 <sup>c</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>c</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	21,2 ± 3,9 <sup>c</sup>	51,4 ± 4 <sup>a</sup>	11,09 ± 22 <sup>c</sup>	6,9 ± 0,7	20,6 ± 4,8	14,9 ± 3	21,5 ± 3,7	14,7 ± 2,7
		HOM <sub>+HAP</sub>	137,7 ± 5,6	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,3	74,2 ± 13,1	0,7 ± 0,1	26,1 ± 1,5	35,9 ± 2,4 <sup>c</sup>	0,4 ± 0 <sup>c</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	19,3 ± 2,4 <sup>c</sup>	52,8 ± 6,8 <sup>a</sup>	175,6 ± 21,3 <sup>c</sup>	4,1 ± 1,1	14,0 ± 0,9	11,0 ± 0,9	10,9 ± 0,9	16,7 ± 2
	2,6-2,9	HOM	29,6 ± 2,7	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	13,3 ± 7,4	0,1 ± 0	41,4 ± 0,7	12,3 ± 1,3 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>	0,1 ± 0 <sup>b</sup>	5,5 ± 3,1 <sup>c</sup>	39,6 ± 19,7 <sup>b</sup>	32,1 ± 14,7 <sup>d</sup>	2,8 ± 1,2	6,0 ± 0,6	0,8 ± 0,7	5,6 ± 3,1	4,0 ± 1,8
		HOM <sub>+HAP</sub>	29,1 ± 1,3	0,1 ± 0	0,3 ± 0,1	8,7 ± 0,9	0,1 ± 0	39,7 ± 0,4	11,5 ± 0,6 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>	0,1 ± 0 <sup>b</sup>	3,4 ± 0,3 <sup>c</sup>	32,5 ± 9,7 <sup>b</sup>	34,0 ± 4,2 <sup>d</sup>	2,2 ± 0,9	4,5 ± 0,2	0,7 ± 0,2	1,9 ± 0,2	3,2 ± 0,4
	>2,9	HOM	68,4 ± 16,2	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	36,0 ± 8,3	0,2 ± 0,1	9,7 ± 0,7	6,7 ± 1,8 <sup>c</sup>	0,1 ± 0 <sup>c</sup>	0,1 ± 0 <sup>b</sup>	3,4 ± 0,9 <sup>c</sup>	38,9 ± 2,9 <sup>ab</sup>	21,1 ± 5,8 <sup>d</sup>	14,1 ± 4,4	3,2 ± 0,9	2,7 ± 0,8	3,4 ± 0,3	2,6 ± 0,7
		HOM <sub>+HAP</sub>	60,7 ± 6,8	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	43,3 ± 9,4	0,2 ± 0,1	9,6 ± 0,7	5,8 ± 1 <sup>c</sup>	0,1 ± 0 <sup>c</sup>	0,1 ± 0 <sup>b</sup>	4,0 ± 0,9 <sup>c</sup>	46,5 ± 8,3 <sup>ab</sup>	21,3 ± 6,9 <sup>d</sup>	11,7 ± 4,9	2,3 ± 0,4	1,7 ± 0,3	2,3 ± 0,6	2,0 ± 0,7

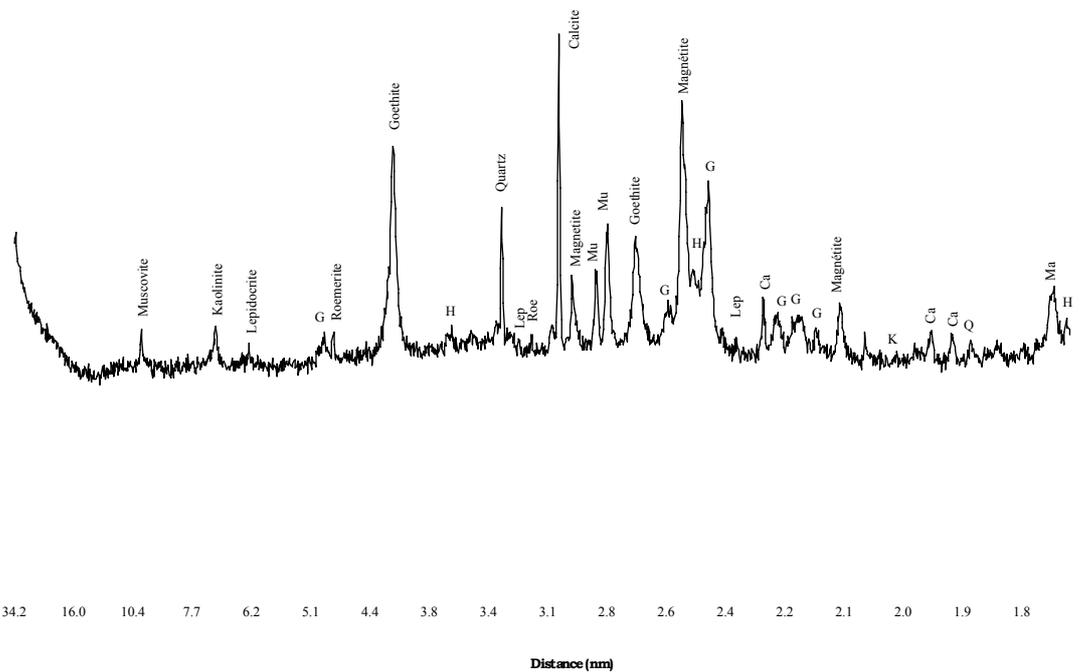
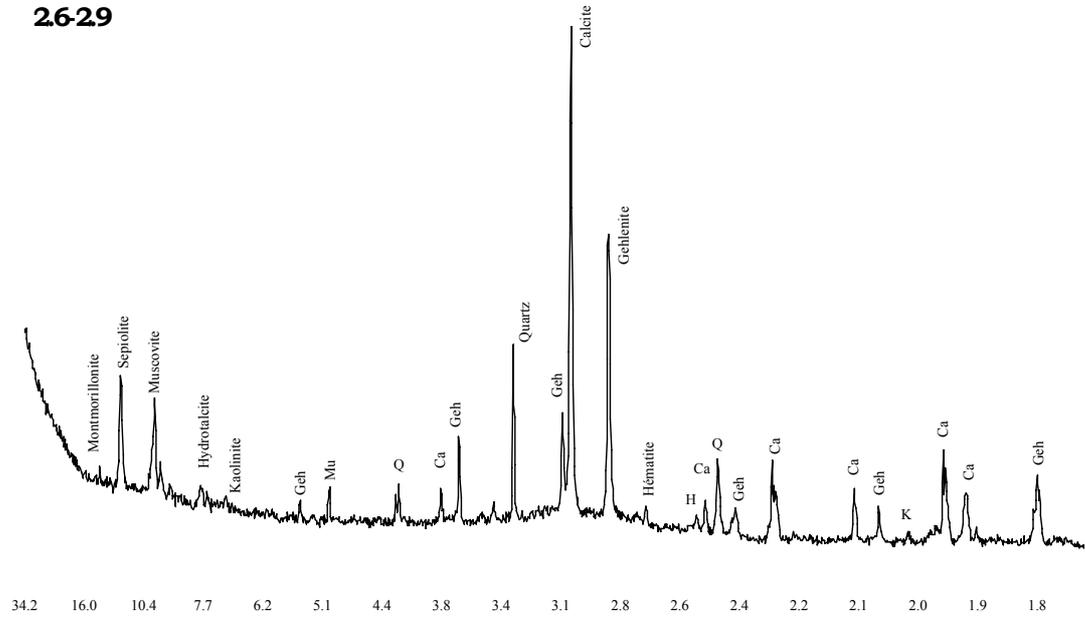
Ce tableau est une synthèse de l'ensemble des résultats obtenus pour les sols HOM et HOM<sub>+HAP</sub> avant et après fractionnement densimétrique.

1.9-26

A



26-29







**Résumé.** Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants persistants retrouvés majoritairement dans l'environnement, qui sont reconnus comme hautement toxiques pour les organismes vivants. Les nombreux travaux réalisés sur les mécanismes contrôlant l'évolution des HAP dans le sol et dans la rhizosphère ont mis en exergue le rôle majeur de la biodégradation par les microorganismes et de la sorption aux constituants du sol. Néanmoins, un manque d'informations persiste concernant le devenir de ces HAP dans le sol, et plus particulièrement leur localisation dans les compartiments du sol ainsi que la nature et le comportement des composés issus de leur dégradation. La thèse avait donc comme principaux objectifs : (a) la localisation des HAP et des produits dérivés dans les compartiments du sol (matières organiques, phases minérales, microorganismes et plante), et (b) la quantification et l'identification des composés organiques formant les résidus liés du sol. Pour cela, nous avons couplé deux approches :

(i) le suivi d'un HAP modèle marqué, le  $^{13}\text{C}$ -phénanthrène ( $^{13}\text{C}$ -PHE), dans un sol artificiellement contaminé planté et non planté pour notamment déterminer par IRMS et NanoSIMS la distribution du C issu du PHE dans les compartiments et pour identifier les composés dérivés du  $^{13}\text{C}$ -PHE par  $^{13}\text{C}$ -RMN et TD/pyGCMS.

(ii) le suivi d'une contamination ancienne et récente en HAP dans un sol historiquement contaminé pour étudier l'influence des matières organiques et des phases minérales (séparées par un fractionnement densimétrique) dans la rétention des HAP.

Plus de 40% du C issu du  $^{13}\text{C}$ -PHE est retenu dans le sol après 14 jours de croissance du ray-grass. L'enrichissement en  $^{13}\text{C}$  observé dans la plante est du même ordre que celui du sol ( $E^{13}\text{C} \approx 0.04 \%$  at.) démontrant une incorporation homogène du  $^{13}\text{C}$ -PHE entre la plante et le sol. Cet enrichissement global dans la plante est confirmé par les images NanoSIMS réalisées sur les racines. Des hotspots en  $^{13}\text{C}$  ont également été observés dans la rhizosphère, et à partir de leur taille, leur forme et leur composition élémentaire en C, N et S ils ont été identifiés comme étant des bactéries, ce qui met en avant leur rôle dans la dynamique des HAP du sol. Dans le sol industriel, la majorité des HAP est retrouvée dans les MO non complexées aux minéraux. En revanche, les HAP fraîchement ajoutés se sont significativement liés aux associations organo-minérales composées de quartz, de feldspaths et de phyllosilicates.

Mots-clés : HAP,  $^{13}\text{C}$ -phénanthrène, IRMS, résidus liés, NanoSIMS, rhizosphère, sol, séparation densimétrique, associations organo-minérales.

**Abstract.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are major persistent pollutants in the environment that are recognized as highly toxic to living organisms. Numerous studies were carried out on the fate of PAHs in soil and in plant rhizosphere and highlighted the major contribution of biodegradation processes and of the sorption to soil constituents. However, a lack of knowledge remains about the fate of PAHs in the soil and especially their location in soil compartments as well as the nature and the behavior of degradation products. The main objectives of the thesis were: (a) to localize PAHs and their derived products within soil compartments (organic matter, minerals, microorganisms and plant), and (b) to quantify and identify the organic compounds forming bound residues. For this purpose, we used two approaches:

(i) the monitoring of a labeled PAH, the  $^{13}\text{C}$ -phenanthrene ( $^{13}\text{C}$ -PHE), in a spiked soil planted or not to determine by IRMS and NanoSIMS the  $^{13}\text{C}$ -distribution into compartments and to identify derived compounds of  $^{13}\text{C}$ -PHE by  $^{13}\text{C}$ -RMN et TD/pyGCMS.

(ii) the distribution and localization of aged and freshly spiked PAH contamination in a brownfield soil to study the impact of organic matter and minerals (using soil densimetric fractionation) in the PAH retention.

More than 40% of C from  $^{13}\text{C}$ -PHE remained in the soil after 14 days of ryegrass growth. The  $^{13}\text{C}$ -enrichment in plant tissue was similarly to the soil enrichment ( $E^{13}\text{C} \approx 0.04 \%$  at.) indicating uniform uptake of  $^{13}\text{C}$ -PHE between the soil and plant. NanoSIMS images acquired for roots confirmed this global enrichment in the plant.  $^{13}\text{C}$ -Hotspots were also observed in the rhizosphere, and on the basis on their size, their shape and their elemental composition in C, N and S, they were identified as bacteria, which emphasize their contribution to the fate of PAHs in soil. In the industrial soil, most of the PAHs were found attached to the free OM. However, the freshly spiked PAHs in the soil were significantly associated with organo-mineral associations containing quartz, feldspars and phyllosilicates.

Keywords: PAHs,  $^{13}\text{C}$ -phenanthrene, IRMS, bound residues, NanoSIMS, rhizosphere, soil, densimetric fractionation, organo-minerals associations.