



HAL
open science

La phytoremédiation assistée par les champignons mycorhiziens à arbuscules des sols historiquement contaminés par les dioxines/furanes : Conséquences sur le microbiote du sol et sur la dissipation des polluants

Hacène Meglouli

► To cite this version:

Hacène Meglouli. La phytoremédiation assistée par les champignons mycorhiziens à arbuscules des sols historiquement contaminés par les dioxines/furanes : Conséquences sur le microbiote du sol et sur la dissipation des polluants. Biologie végétale. Université du Littoral Côte d'Opale, 2017. Français. NNT : 2017DUNK0490 . tel-03038698

HAL Id: tel-03038698

<https://theses.hal.science/tel-03038698>

Submitted on 3 Dec 2020

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DU LITTORAL COTE D'OPALE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Ecole Doctorale : Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement
Filière : Ingénierie des Fonctions Biologiques

par

Hacène MEGLOULI

La phytoremédiation assistée par les champignons mycorhiziens à arbuscules des sols historiquement contaminés par les dioxines/furanes : conséquences sur le microbiote du sol et sur la dissipation des polluants

Soutenue le 15 septembre 2017 devant la commission d'examen :

BUEE M. , Directeur de recherche, Université de Lorraine, France	Rapporteur
MENCH M. , Directeur de recherche, Université de Bordeaux, France	Rapporteur
HIJRI M. , Professeur, Université de Montréal, Canada	Examinateur
LERCH.Th , Maître de conférences-HDR, UPEC-IEES Créteil Paris, France	Examinateur
LOUNES-HADJ SAHRAOUI A. , Professeur, ULCO, France	Directrice de thèse
FONTAINE J. , Maître de conférences-HDR, ULCO, France	Co-directeur de thèse

*Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV), Calais
50, rue Ferdinand Buisson, BP 669 - 62228 Calais cedex*

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier M^r **Dominique Courcot**, Professeur à l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO) et Directeur de l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV), pour ses encouragements et son oreille attentive.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à M^{me} **Anissa Lounes-Hadj Sahraoui**, Professeur à l'ULCO et directrice de cette thèse, pour la qualité de son encadrement, un savant mélange de confiance, de conseils et d'exigence, qui laisse place à la créativité dans un cadre de rigueur, et dans une ambiance toujours stimulante ! Merci pour vos qualités scientifiques et humaines. Un merci tout particulier pour le temps attentif (diurne ou nocturne) que vous avez passé sur les relectures et corrections méticuleuses de chaque poster, présentation, article, résumé, dossier, ... et il y en a eu !

Un merci également à M^r **Joël Fontaine**, Maître de conférences-HDR à l'ULCO et co-directeur de thèse, pour avoir su être complémentaire dans mon encadrement. Je retiens tout particulièrement votre capacité à rendre simples les situations qui semblaient compliquées et je lui dois beaucoup également.

Je remercie M^{me} **Maryline Magnin-Robert**, Maître de conférences à l'ULCO, pour les conseils lors de la rédaction des articles et la présente thèse, notamment en biologie moléculaire.

Je remercie M^r **Marc BUEE**, Directeur de recherche à l'INRA à l'Université de Lorraine et M^r **Michel MENCH**, Directeur de recherche à l'université de Bordeaux, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également Mr **Mohamed HIJRI**, Professeur à l'Université de Montréal et M^r **Thomas LERCH**, Maître de conférences à l'Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Paris - Université Paris-Est Créteil Val de Marne, d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

La réalisation de cette thèse a été possible grâce à plusieurs collaborateurs que je tiens remercier ici :

- Pr **Mohamed HIJRI** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour mon stage doctoral. Sans vous la métagénomique serait restée un rêve, je ne peux oublier votre accueil chaleureux, merci pour votre disponibilité, vos conseils tout au long de cette période et de m'avoir fais visiter Génome Quebec.

Remerciements

- *Dr Yolande Dalpé, Directrice de recherche à Agriculture and Agri-Food Canada à Ottawa (Research and Development Centre) pour l'identification des spores des champignons mycorhiziens à arbuscules.*
- *Dr Antoine Richard et Caria Giovanni du Laboratoire d'analyses des sols de l'INRA d'Arras pour les dosages de dioxines/furanes.*
- *Dr Dominique Verhaghe, Ingénieur de recherche à l'ULCO et responsable du pôle Calcul Scientifique – ScoSI, pour ton aide, notamment en bio-informatique, tu m'as fait découvrir le mode « Batch » qui facilite beaucoup la tâche.*
- *Dr Frédérique CHANGEY, post-doctorante à l'UCEIV, pour son aide dans les extractions d'ADN et pour les analyses de T-RFLP réalisées en collaboration avec le Dr Thomas LERCH (résultats non présentés dans la présente thèse).*

Un grand merci à Benoît Tisserant, Ingénieur de Recherche à l'UCEIV-Calais, « Expert des mycorhizes » pour ta disponibilité lors du lancement et de récupération des « méga-expériences » et notre discussion enrichissante.

Merci à Frédéric Laruelle, Ingénieur de recherche à l'UCEIV-Calais, pour les analyses des lipides par chromatographie et spectroscopie de masse.

Merci à Natacha Bourdon, technicienne à l'UCEIV-Calais, qui m'a aidé au quotidien surtout lors de montage des lames innombrables.

Je tiens à remercier également Anthony Verdin, Ingénieur de recherche à l'UCEIV-Dunkerque, pour ta disponibilité et tes conseils pour la partie spectrofluorométrique et pour ta collaboration dans la partie « Cytotoxicité ».

Je remercie également les organismes ayant participé au financement de cette thèse (l'ADEME, la Métropole Européenne de Lille et la région Hauts-de-France dans le cadre du Programme Chercheurs-Citoyens, PO FEDER) ainsi qu'Annabelle CARLIER (chargée de mission à l'association Halluin Recherche, Réseau, Requalification (H3R)).

Je souhaite remercier les membres de l'UCEIV-Calais pour les bons moments passés en votre compagnie. Je nomme Béatrice, Philippe et surtout Corinne et Sandrine qui prennent les étudiants sous leurs ailes.

Remerciements

*Je remercie également l'ensemble des doctorants et post-doctorants, stagiaires de l'UCEIV encore présents ou non : **Sonia, Maryline, Ghalia, Ingrid, Karima, Sihem, Giang, Christine, Maréva, Alice, Morgane, Melodie, Imad, Abder et Robin.***

*Une pensée toute particulière pour **papa** et mon **oncle** et je remercie ma **mère** toujours présente malgré la distance qui nous sépare, merci à ma tante **Saada** et mes frères **Azzedine, Chérif, Toufik et Ali** sans oublier mon neveu **Ahmed-Iyad**. Je remercie également ma belle famille.*

*Merci à toi **Amel**, ma chère épouse, pour ta patience et ton soutien qui ont grandement facilité cette thèse. Pour finir un grand merci d'amour à mon petit **Kossayla** pour avoir partagé son papa avec ce deuxième bébé de papier.*

Merci à toi, personne oubliée dans ces remerciements.

Tables des matières

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures hors publications	ii
Liste des tableaux hors publications	iii
Introduction générale.....	1
Partie I. Synthèse bibliographique	
I. Dioxines et Furanés	4
I.1. Définition	4
I.2. Caractéristiques physico-chimiques.....	5
I.3. Les principales sources de PCDD/F.....	6
I.3.1. Procédés thermiques	7
I.3.2. Procédés chimiques industriels.....	8
I.4. Comportement des PCDD/F dans les sols	8
I.5. La toxicité des PCDD/F.....	9
I.6. Contexte réglementaire de la gestion des sites et sols pollués par les PCDD/F	11
II. La phytoremédiation.....	12
II.1. Généralités	12
II.1.1. Phytostabilisation	13
II.1.2. La phytoextraction.....	14
II.1.3. La phytodégradation	14
II.1.4. La rhizodégradation ou phytostimulation.....	14
II.2. Phytoremédiation des sols pollués par les PCDD/F	15
II.2.1. Phytoremédiation assistée	16
II.2.1.1. Phytoremédiation assistée par les CMA.....	16
II.2.1.2. Phytoremédiation assistée par l'ajout de biosurfactants	20
II.2.1.3. Introduction des microorganismes à capacité dégradante.....	22
III. Biodégradation des PCDD/F par les microorganismes du sol.....	23
III.1. Généralités	23
III.2. Dégradation des PCDD/F en condition aérobie	23
III.2.1. Implication des bactéries	23
III.2.2. Implication des champignons saprotrophes	26
III.3. Dégradation des PCDD/F en conditions anaérobies	28
IV. La biodiversité des communautés microbiennes du sol.....	30

Table des matières

IV.1. Facteurs influençant la composition des communautés microbiennes du sol	30
IV.1.1. Facteurs abiotiques	31
IV.1.2. Facteurs biotiques	32
V. Cadre général et objectifs du projet de thèse	35

Partie II. Matériels et Méthodes

1. Présentation du site expérimental de la Ferme de Noir Pot à Halluin.....	38
2. Prélèvement du sol sur la parcelle expérimentale.....	40
3. Les dispositifs expérimentaux en microcosmes.....	42
3.1. Expérimentation 1 : Importance du choix de l'espèce végétale dans la phytoremédiation des sols contaminés par les PCDD/F (publication 1, partie 3).	42
3.2. Expérimentation 2 : Influence de l'origine de l'inoculum mycorhizien sur la phytoremédiation des sols pollués par les PCDD/F (publication 2, partie 3).....	43
3.3. Expérimentation 3 : optimisation des conditions de phytoremédiation des sols pollués par les PCDD/F (publication 3, partie 3).....	44
4. Mesure des développements fongiques et végétaux	45
4.1. Détermination de la biomasse sèche aérienne et racinaire.....	45
4.2. Détermination du taux de mycorhization	46
5. Extraction et quantification des PCDD/F dans le sol et dans le matériel végétal	46
5.1. Extraction et quantification des PCDD/F dans le sol	46
5.2. Extraction et quantification des PCDD/F dans le matériel végétal	47
6. Dosage du contenu pigmentaire dans les parties aériennes	48
7. Mesure de l'activité microbienne du sol.....	48
7. 1. Dosage de la fluorescéine di-acétate hydrolase (FDA Hydrolase).....	48
7. 2. Dosage de la déshydrogénase	49
8. Caractérisation des communautés microbiennes du sol	49
8.1. Extraction de l'ADN génomique	49
8.2 Séquençage à haut débit : étude de la biodiversité.....	50
8.2.1. PCR.....	50
8.2.2. Illumina sequencing.....	51
8.3 Analyses bioinformatiques	53
9. Evaluation de la cytotoxicité des sols.....	53
9. Analyses statistiques	54

Table des matières

Partie III. Résultats

Présentation de la publication 1	56
Publication 1.....	58
Présentation de la publication 2	94
Publication 2.....	96
Présentation de la publication 3	122
Publication 3.....	124
Synthèse et perspectives.....	149
Références.....	158
Valorisation	185

Publication 1: Arbuscular mycorrhizal fungi - assisted phytoremediation of aged dioxin/furan-contaminated soil: influence on rhizosphere microbial communities and on pollutant dissipation.

Publication 2: Arbuscular mycorrhizal inoculum origin influences microbial community structure of aged dioxin/furan-contaminated soil but not the pollutant dissipation rate.

Publication 3: Enhancing dioxin/furan dissipation in an aged contaminated soil using microbes-assisted phytoremediation and biosurfactant.

Liste des abréviations

ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNg	Acide Désoxyribonucléique génomique
ASE	Accelerated Solvent Extraction
BRGM	Bureau de Recherche Géologique et Minière
BTEX	Benzène, Toluène, Éthylbenzène et Xylènes
CCI	Chambre de Commerce et d'Industrie
CITEPA	Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique
CMA	Champignon Mycorhizien à Arbuscules
DD	Dibenzodioxine
DF	Dibenzofurane
DHA	Deshydrogénase
DO	Densité Optique
DJA	Dose Journalière Admissible
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
dNTP	Désoxyribonucléotides
EDTA	Ethylène Diamine Tetraacetic Acide
EEA	Agence européenne pour l'environnement
ETM	Elément traces métalliques
FDA	Fluoresceine di-acetate
FEDER	Fonds Européen de Développement Régional
Fm	<i>Funneliformis mosseae</i>
G	Grossissement
GC/HRMS	Gaz Chromatography/ High Resolution Mass Spectrometry
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
INRA	Institut national de la recherche agronomique

Liste des abréviations

IRENI	Institut de recherche en environnement industriel
ISRIC	International Soil Reference and Information Centre
ITS	Internal Transcribed Spacer
KGy	Kilogray
K_{ow}	Coefficient de partage Octanol / Eau
LDH	Lactate Deshydrogénase
LMCU	Lille Métropole Communauté Urbaine
MDH	Mitochondrial Dehydrogenase
MW	Mégawatt
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCB	Polychlorobiphényle
PCDD/F	PolyChloroDibenzoDioxine / Furane
PCR	Polymerase Chain Reaction
POP	Polluants Organiques Persistants
p/v	Poids/volume
RDA	Redundancy Analysis
Rh	Rhamnolipides
SPE	Solid Phase Extraction
TEF	Toxic Equivalency Factor
TEQ	Equivalent toxique
UCEIV	Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant
UFC	Unité Formant Colonie
ULCO	Université du Littoral Côte d'Opale
VCI	Valeurs de Constat d'Impact
v/v/v	Volume/volume/volume

Liste des figures (hors publications)

Figure 1 : Structure chimique des dioxines/furanes (PCDD/F).

Figure 2 : Récapitulatif des différents processus de phytoremédiation

Figure 3 : Schéma des structures intra-racinaires de CMA (Brundrett, 2008).

Figure 4 : Implication des champignons mycorhiziens arbusculaires dans la phytoremédiation du sol contaminé par des hydrocarbures (Rajtor, Piotrowska-Seget, 2016).

Figure 5: Structure moléculaire de biosurfactants (A) surfactines produites par *Bacillus subtilis*, (B) sophorolipides produits par *Candida bombicola*, (C) succinoyltréhalose lipidique produit par *Rhodococcus erythropolis*, (D) Rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* (Delort et al., 2010).

Figure 6 : La voie de biodégradation catabolique de la dibenzo-p-dioxine et du dibenzofurane (Chakraborty et Das 2016)

Figure 7 : Voie de dégradation de 27-dichlorobenzo-p-dioxine (27-DCDD) par un champignon de la pourriture blanche : *Phanerochaete chrysosporium* (Valli et al., 1992).

Figure 8 : Voie de biotransformation anaérobie de 1234-TeCDD dans les sédiments avec des cultures pures de *Dehalococcoides* spp. (Fennell et al., 2004).

Figure 9 : Vue aérienne du site de la ferme de Noir Pot (rectangle rouge).

Figure 10 : Répartition spatiales des 72 échantillons selon la grille non alignée et présentation par cartogramme et interpolation spatiale des concentrations totales de PCDD/F en équivalent toxique (analyses statistiques réalisées par l'unité Infosol de l'INRA d'Orléans).

Figure 11 : Teneurs cumulées des différents congénères de PCDD/F dans chaque échantillon de sols.

Figure 12 : Teneurs cumulées des différents congénères de PCDD/F dans le sol stérilisé avant phytoremédiation.

Figure 13 : Principe de la technologie Illumina (<http://www.illumina.com>)

Figure 14 : Schémas d'ajout d'un terminateur réversible (<http://oezratty.net/wordpress/2012/technologies-sequançage-gnome-humain-3/>)

Liste des tableaux (hors publications)

Tableau 1 : Répartition des congénères des PCDD/F en fonction du nombre d'atomes de chlore

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques des PCDD/F (Ritter et al 1996).

Tableau 3 : Facteur d'équivalence de toxicité (TEQ) des 17 congénères PCDD/F pour les mammifères, humains compris (Le Cloirec et Laplanche, 2005).

Tableau 4 : Valeurs de Constat d'Impact (VCI) dans les sols en France

Tableau 5 : Caractéristiques pédo-agronomiques du sol d'Halluin avant et après stérilisation aux rayons gamma (45KGy).

Tableau 6 : Exemple de calcul de la concentration d'un échantillon en TEQ

Tableau 7 : Caractéristiques du programme et des amorces utilisées dans le cadre des PCR pour le séquençage.

Introduction générale

Introduction Générale

Introduction générale

Depuis le siècle dernier, le développement de nos sociétés modernes a été marqué par un accroissement de la dispersion dans l'environnement de molécules qui s'avèrent toxiques pour les organismes et perturbent donc le bon fonctionnement des écosystèmes. Parmi ces molécules, les polychlorobenzodioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF), appelés plus communément dioxines/furanes (PCDD/F), sont libérés dans l'environnement à faibles doses lors de divers processus anthropogéniques de combustion et de synthèses chimiques industrielles. La quantité annuelle de PCDD/F émises dans le monde a été chiffrée à 17 226 kg (Dopico et Gómez, 2015). Libérées dans l'atmosphère, ces molécules peuvent se fixer sur des particules et parcourir des distances considérables dans l'atmosphère. On considère que seuls 3% des émissions de PCDD/F dans l'atmosphère restent dans l'air alors que 40% sont absorbés dans les eaux des océans et 57% se déposent à la surface des sols (Booth et al., 2013; Morales et al., 2014). Bien que des efforts aient été consentis par les industries depuis une quinzaine d'années pour améliorer leurs procédés et réduire ces contaminants de leurs rejets atmosphériques (93% de réduction des émissions de PCDD/F en 1990 et 2015 en France métropolitaine ; source Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique CITEPA, 2016), de nombreux sols restent contaminés. Les concentrations observées dans des échantillons de sols non pollués sont de l'ordre de grandeur du picogramme (pg)/g de sol. Les teneurs en PCDD/F dans les sols dits industriels peuvent quant à eux atteindre des valeurs cent fois supérieures (Epe et al., 2006). La grande stabilité des PCDD/F et leur caractère lipophile les prédisposent donc à une longue persistance dans l'environnement ainsi qu'à une bioaccumulation dans les chaînes trophiques. La toxicité chez l'homme pour une exposition chronique à faible dose est encore un sujet controversé car les études sur ce sujet sont difficiles à mettre en œuvre. Cependant, certaines études épidémiologiques rapportent une augmentation du nombre de cancers chez les personnes exposées à la dioxine la plus toxique : la 2378 TCDD (appelée aussi « dioxine Seveso »), seule dioxine classée par le centre international de recherche sur le cancer comme substance « cancérigène pour l'homme ». Si le seul argument de santé milite pour une décontamination des sites et sols pollués, il ne faut pas oublier qu'à cause du danger qu'ils présentent, tous ces sites pollués sont inutilisables en l'état, autant de surface perdue, à moins d'une réhabilitation *ad hoc*. L'enjeu est d'autant plus important que nombre de sites pollués se trouvent souvent en zone urbaine où la pression foncière est extrêmement forte et où il convient de restreindre l'étalement urbain dommageable à l'environnement. C'est ainsi que sur le plan national, la loi

Introduction générale

Grenelle II vise à achever l'inventaire des sites pollués «historiques» afin d'établir les priorités d'action (présence de points d'eau, populations sensibles exposées...) et souligne dans son article 43 l'importance d'utiliser les techniques de dépollution par les plantes. La phytoremédiation utilise la capacité naturelle des plantes et des microorganismes associés à contenir, biodégrader ou minéraliser les polluants. Cette phytotechnologie est jugée plus conforme aux enjeux du développement durable que les techniques physico-chimiques, qui en dépit de leur rapidité, conduisent à l'altération des propriétés biologiques du sol. En plus d'être écologique, la phytoremédiation présente les avantages d'être moins onéreuse et plus facile à mettre en œuvre que les procédés physico-chimiques. C'est également une technique bien adaptée aux traitements *in situ* de grandes surfaces présentant une bonne intégration paysagère. Bien que cette méthode ait fait l'objet de nombreux travaux de recherche depuis les années 1990, les connaissances restent encore parcellaires et l'application « pratique » de cette technologie n'est qu'à ses balbutiements et est mal maîtrisée. Cette phytotechnologie est encore souvent limitée en termes d'efficacité, en particulier lorsqu'il s'agit de composés chlorés en raison de leur récalcitrance, de leur phytotoxicité et de leur faible biodisponibilité dans le sol.

L'optimisation de cette méthode passe par un choix adéquat de l'espèce végétale et notamment par l'utilisation de plantes tolérantes aux polluants et favorisant la croissance des populations microbiennes rhizosphériques à capacité dégradantes. En effet, les racines modifient les propriétés physico-chimiques de la rhizosphère et stimulent l'activité microbienne du sol. Parmi les microorganismes qui influencent les processus rhizosphériques figurent les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) qui sont omniprésents dans la plupart des sols naturels et anthropisés (Smith et Read, 2008). On estime que plus de 80% des plantes terrestres vivent en symbiose avec ces champignons (Bonfante et Perotto, 1995). Les CMA procurent de nombreux avantages à la plante hôte, dont une meilleure croissance due à une nutrition hydrique et minérale améliorée, ainsi qu'à une meilleure tolérance aux stress biotiques et abiotiques (Clark et Zeto, 2000 ; Turnau et Haselwandter, 2002). En plus de l'effet protecteur apporté par les CMA aux plantes, il a été démontré que ces champignons pouvaient contribuer à la dissipation des polluants chlorés tels que les polychlorobiphényles (PCB) (Teng et al., 2010 ; Lu et al., 2014 ; Qin et al., 2016). Néanmoins, très peu d'études décrivent le rôle des plantes mycorhizées dans la phytoremédiation des sols historiquement pollués par les PCDD/F. Ainsi, lors de ce travail de thèse, nous nous sommes fixés comme

Introduction générale

principal objectif l'investigation du potentiel des mycorhizes dans la phytoremédiation et la gestion d'un sol historiquement pollué par les PCDD/F.

Ce manuscrit de thèse est composé de trois parties. Après une introduction générale rappelant la problématique des sites et sols pollués, la première partie de ce manuscrit correspond à une synthèse bibliographique présentant les PCDD/F, l'influence des plantes et des communautés microbiennes dans le devenir de ces composés chlorés dans le sol, amenant au cadre général, à la présentation du programme de recherche « Dioxines : contamination et biodégradation » auquel est rattaché cette thèse ainsi qu'aux objectifs de la thèse. La deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisés dans le cadre de ce travail. La troisième partie est dédiée aux résultats obtenus et leurs discussions structurés sous forme de trois chapitres, rédigés en anglais et présentés sous formes d'articles qui seront soumis pour le premier dans *Frontiers in Microbiology*, le deuxième dans *Mycorrhiza* et le troisième dans *The Journal of Hazardous Materials*.

Enfin, ce manuscrit se termine par une synthèse générale, les perspectives envisagées pour la poursuite de ce travail ainsi que les références bibliographiques citées dans les parties 1 et 2. Les différentes valorisations et communications auxquelles j'ai participé durant mes années de thèse seront présentées en annexe.

Partie – I – Synthèse bibliographique

Partie I.

Synthèse bibliographique

I. Dioxines et Furanes

I.1. Définition

Le terme générique « dioxines » désigne deux familles de composés aromatiques tricycliques halogénés : les polychlorodibenzodioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF). Ces polluants organiques persistants (POP) sont constitués de deux noyaux benzéniques interconnectés par deux atomes d'oxygène tandis que les PCDF se différencient des PCDD par la présence d'un seul atome d'oxygène dans le cycle central (Figure 1).

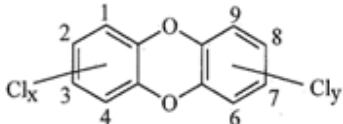
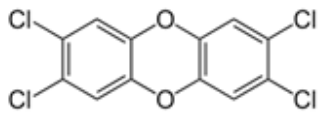
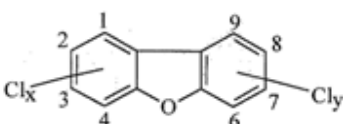
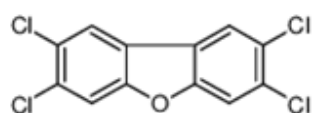
Famille	Formule générique	Exemple
Dioxines		 <p>2378-tétrachlorodibenzo-p-dioxine</p>
Furanes		 <p>2378-tétrachlorodibenzofurane</p>

Figure 1 : Structure chimique des PCDD/F.

Le contenu en chlore de ces molécules peut varier de 1 à 8 atomes. Il existe donc un grand nombre de congénères se différenciant suivant le nombre et la position d'atomes de chlore: 75 PCDD et 135 PCDF (Tableau 1). Le congénère le plus connu est la 2378-tétrachlorodibenzodioxine (2378-TCDD) dite « dioxine de Seveso », suite à la catastrophe de Seveso qui s'est produite le 10 juillet 1976 dans l'usine ICEMESA au nord de l'Italie (Wilson, 1982). Du fait de leurs toxicités, 17 des 210 congénères de PCDD/F suscitent un intérêt particulier (7 congénères des PCDD et 10 congénères des PCDF). Ces 17 congénères contiennent au minimum quatre atomes de chlore (Kulkarni et al., 2008) et présentent une

toxicité proche de celle de la dioxine de Seveso (2378-TCDD), dioxine la plus toxique. Les teneurs en PCDD/F sont exprimées soit en concentration massique ou en équivalents toxiques (TEQ) qui consiste à multiplier la concentration massique de chaque congénère par son facteur d'équivalent toxique (TEF).

Tableau 1 : Répartition des congénères des PCDD/F en fonction du nombre d'atomes de chlore

Nombre de chlore	1	2	3	4	5	6	7	8	Total
Préfixe	mono M	di D	tri Tr	tétra T	penta Pe	hexa Hx	hepta Hp	octa O	
Nombre d'isomères PCDD	2	10	14	22	14	10	2	1	75
Nombre d'isomères PCDF	4	16	28	38	28	16	4	1	135

I.2. Caractéristiques physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques communes des PCDD/F sont leurs grandes stabilités thermique (jusqu'à 800°C) et chimique, mais aussi leur très faible solubilité dans l'eau. Leurs propriétés physico-chimiques sont étroitement liées au degré de chloration des structures aromatiques. Plus les congénères sont chlorés et moins ils sont solubles dans l'eau. Le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) traduit la répartition d'une molécule d'un soluté entre la phase lipophile (octan-1-ol) et la phase hydrophile (eau), et donne une indication sur la capacité de la molécule à s'adsorber sur des surfaces hydrophobes (Mackay et al., 1992). D'après le Tableau 2, les valeurs de K_{ow} augmentent globalement avec le degré de chloration des PCDD/F (d'après le rapport BRGM-53070-FR). En revanche, la pression de vapeur qui sert à estimer la tendance d'un produit à se volatiliser, diminue avec l'augmentation du degré de chloration.

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques des PCDD/F (Ritter et al 1996).

Groupe de congénères	Poids moléculaire (g/mole)	Pression de vapeur (Pa x 10 ⁻³)	Solubilité dans l'eau (mg/m ³)	Log K _{ow}
Dioxines				
monoCDD	218,5	73-75	295-417	4,75-5,00
diCDD	253,0	2,47-9,24	3,75-16,7	5,60-5,75
triCDD	287,5	1,07	8,41	6,35
tétraCDD	322,0	0,00284-0,275	0,0193-0,55	6,60-7,10
pentaCDD	356,4	0,00423	0,118	7,40
hexaCDD	391,0	0,00145	0,00442	7,80
heptaCDD	425,2	0,000177	0,0024	8,00
OCDD	460,0	0,000953	0,000074	8,20
Furanes				
diCDF	237,1	14,6	14,5	5,44
triCDF	306,0	0,199	0,419	6,1
pentaCDF	340,42	0,0172	0,236	6,5
hexaCDF	374,87	0,0031-0,00036	0,0177-0,0083	7,0
heptaCDF	409,31	0,00054-0,00057	0,00135	7,4
OCDF	443,8	0,000101	0,00116	8,4

I.3. Les principales sources de PCDD/F

Les émissions de PCDD/F dans l'atmosphère ont fortement diminué depuis les années 2000. Cette forte diminution s'explique par les progrès réalisés dans les domaines du traitement des déchets par incinération et de la sidérurgie. Ces deux secteurs ont contribué majoritairement aux émissions des PCDD/F mais aussi à la réglementation qui impose une valeur seuil en PCDD/F beaucoup plus basse à l'émission (Sawerysyn et Visez. 2003). L'Union Européenne a inscrit dans son cinquième programme d'action pour l'environnement

un objectif de réduction de 90 % des émissions en PCDD/F entre 1985 et 2005. En France, la quantité totale de PCDD/F d'origine industrielle a été réduite de moitié entre 1985 et 1996 et la quantité totale des émissions de PCDD/F a été réduite de 93,4% entre 1990 et 2014 (CITEPA, Avril 2016). En revanche, les sols restent contaminés pendant de longues périodes au vu du temps de demi-vie des PCDD/F, qui peut varier de 30 ans pour l'OCDF et l'HpCDF à 170 ans pour l'HpCDD (Kjeller et Rappe, 1995).

L'évolution des teneurs en PCDD/F dans les sols dépend de plusieurs facteurs :

- Le déplacement de la pollution : volatilisation des polluants du sol vers l'air, ingestion par les animaux, érosion et captation par les végétaux ;
- Une dégradation physico-chimique (photolyse notamment) ;
- Une dégradation biologique ;
- La mise en place d'une liaison irréversible entre les PCDD/F et le sol.

Les teneurs en PCDD/F dans les sols non pollués en Europe, exprimées en équivalents toxiques (TEQ), sont généralement de l'ordre de 1-2 ng TEQ/Kg. Les teneurs moyennes en PCDD/F mesurées dans les sols de différentes régions françaises font état de valeurs de référence comprises entre 0,02 et 1 ng TEQ /Kg de sol sec en zones rurales, 0,2 et 17 ng TEQ /Kg de sol sec en zones urbaines et de 20 et 60 ng TEQ /Kg de sol sec en zones industrielles (Inserm, 2000).

Les principales sources des PCDD/F sont les suivantes :

I.3.1. Procédés thermiques

Les PCDD/F sont formées à l'état de traces dans des procédés de combustion lorsque le carbone, l'oxygène et le chlore sont présents dans une gamme de température comprise entre 200°C et 650°C. Ces procédés sont :

- Incinération des déchets ménagers et hospitaliers,
- Incinération des déchets industriels et des boues,
- Brûlage des gaz de décharge,
- Transport routier,
- Combustion de charbon de bois,
- Combustions accidentelles des PCB des transformateurs.

Parmi les secteurs les plus émetteurs des PCDD/F, on trouve le résidentiel (44%, brûlage de câbles, chaudières < 50 MW), la métallurgie des métaux ferreux (16%), les automobiles roulant au diesel (12%), la transformation des combustibles minéraux solides-sidérurgie (8,3%) et l'agriculture (4,6%) (CITEPA, 2016).

I.3.2. Procédés chimiques industriels

Dans les procédés de production chimique, la formation des PCDD/F est favorisée si une ou plusieurs des conditions ci-après sont remplies (Huntzinger et Fiedler, 1993) : de hautes températures (> 150°C), des conditions alcalines, la catalyse par des métaux et les traitements d'irradiation UV. Les phénols chlorés et leurs dérivés, les aromatiques chlorés et leurs dérivés, les substances aliphatiques chlorées, les catalyseurs et les produits minéraux chlorés utilisés dans différents procédés de fabrication sont sources de PCDD/F (Programme des Nations Unies pour l'Environnement, 2005).

Les PCDD/F peuvent donc être formés selon trois voies (Tuppurainen et al., 1998 ; McKay 2002 ; Stanmore 2004):

- Voie homogène à partir de précurseurs gazeux,
- Voie hétérogène à partir de précurseurs gazeux réagissant à la surface de cendres volantes,
- Voie hétérogène à partir du carbone imbrûlé (synthèse *de novo*) contenu dans les cendres volantes et différents gaz inorganiques.

I.4. Comportement des PCDD/F dans les sols

Le comportement des PCDD/F dans le sol est influencé par plusieurs paramètres notamment la nature du sol, son pH ou son taux d'humidité. De manière générale, les PCDD/F s'adsorbent à la surface des particules d'argile, de limon, de sable et à la matière organique du sol entraînant la rémanence de ces composés dans les sols (Sahle-Demessie et al., 2000 ; Banerji et al., 1993). L'accumulation des PCDD/F est souvent située à la surface du sol en raison de leur quasi-insolubilité dans l'eau (Isosaari 2004; Kitunen et al., 1990). En effet, on considère que plus de 90% des PCDD/F sont présents dans les 10 premiers centimètres du sol, ce qui indiquerait un faible risque de contamination des nappes phréatiques par ces polluants (INSERM, 2000).

I.5. La toxicité des PCDD/F

Du fait de leur grande toxicité, la contamination du sol par les PCDD/F représente des risques importants pour la santé de l'Homme et l'environnement.

Chez l'homme, une exposition à de fortes doses peut être à l'origine à court terme de lésions cutanées comme les chloracnés, ou d'une altération de la fonction hépatique (Mandal, 2005). Une exposition plus prolongée provoque une atteinte du système immunitaire, une perturbation du développement du système nerveux, des troubles du système endocrinien et de la reproduction, ainsi que le développement de cancer (Nasr et al., 2012). En effet, l'Agence internationale de recherche sur le cancer (CIRC) a classé en 1997 la TCDD en tant que cancérigène du groupe I qui correspond au groupe des agents cancérigènes avérés ou certains pour l'Homme (Zambon et al., 2007).

En cas d'ingestion, la toxicité des PCDD/F est due à leur interférence avec les systèmes enzymatiques tel que le récepteur de l'acide rétinoïque (dérivé oxydé de la vitamine A) entraînant des perturbations du stockage de la vitamine A (Jacobs et al., 2011). Parmi les 210 congénères de PCDD/F, 17 d'entre eux possèdent un potentiel toxique vis-à-vis d'un même récepteur Ah (aryl-hydrocarbène). Le récepteur Ah est présent dans de nombreux tissus d'espèces appartenant au règne animal.

Les PCDD/F les plus toxiques sont les congénères chlorés en position latérale (2,3,7,8). La potentialité toxique des 17 congénères peut être exprimée en référence au composé ayant la plus grande toxicité, par l'intermédiaire du concept d'équivalent toxique (TEF). Celui-ci a été développé à partir de 1977 pour donner une valeur toxicologique à un mélange de composés chimiquement proches et ayant le même mécanisme d'action, c'est-à-dire actifs sur le même récepteur. Dans le cas des PCDD/F, la toxicité des différents congénères est rapportée au composé le plus toxique, la 2,3,7,8-TCDD à laquelle est attribué le facteur TEF maximal de 1. Défini à partir de résultats *in vitro* modulés par les données *in vivo* (études de cas d'expositions accidentelles ou d'expositions professionnelles fortes), le TEF est réévalué fréquemment par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (Tableau 3).

Pour un mélange donné, le calcul en TEQ consiste à multiplier la concentration massique de chaque congénère par son TEF puis à additionner l'ensemble des valeurs :

$$\text{Concentration en TEQ} = \sum_{1-17} (\text{TEF} \times \text{concentration massique du PCDD/F})$$

Partie – I – Synthèse bibliographique

L'OMS a établi depuis 1998 un seuil toxicologique de référence appelée « dose journalière admissible » (DJA) pour les PCDD/F. Ainsi, pour une exposition orale chronique quotidienne, le seuil déterminé est de 1 à 4 pg TEQ/kg/jour. Néanmoins depuis 2001, la valeur de référence est une dose mensuelle tolérable de 70 pg TEQ_{OMS}/kg p.c./mois (soit 2,33 pg TEQ_{OMS}/kg p.c./j).

Tableau 3 : Facteur d'équivalence de toxicité (TEQ) des 17 congénères PCDD/F pour les mammifères, humains compris (Le Cloirec et Laplanche, 2005).

Nom	TEF (OMS 1998)	TEF (OMS 2005)
Dioxines		
2378-TCDD	1	1
12378-PeCDD	1	1
123478-HxCDD	0,1	0,1
123678-HxCDD	0,1	0,1
123789-HxCDD	0,1	0,1
1234678-HpCDD	0,01	0,01
OCDD	0,0001	0,0003
Furanes		
2378-TCDF	0,1	0,1
12378-PeCDF	0,05	0,03
23478-PeCDF	0,5	0,3
123478-HxCDF	0,1	0,1
123678-HxCDF	0,1	0,1
123789-HxCDF	0,1	0,1
234678-HxCDF	0,1	0,1
1234678-HpCDF	0,01	0,01
1234789-HpCDF	0,01	0,01
OCDF	0,0001	0,0003

I.6. Contexte réglementaire de la gestion des sites et sols pollués par les PCDD/F

Etant donné l'impact négatif avéré des POP sur la santé de l'Homme et des écosystèmes dont les oiseaux et les végétaux, deux textes internationaux majeurs visant à contrôler les émissions de ces polluants ont été signés en juin 1998 (protocole d'Aarhus) et en mai 2001 (convention de Stockholm). Depuis, des efforts ont été consentis par les entreprises, pour améliorer les procédés industriels et réduire les teneurs en PCDD/F de leurs rejets atmosphériques.

En ce qui concerne l'étude et la gestion des sites et des sols contaminés, l'une des premières difficultés rencontrées aujourd'hui est qu'il n'y a pas de réglementation harmonisée au niveau européen. En effet, une directive cadre sur le sol a été proposée en 2006 pour protéger le sol contre les menaces qui l'affectent et qui comprennent la contamination chimique. Cependant, cette directive n'est toujours pas entrée en vigueur (stratégie thématique pour la protection des sols, 2006). Il en résulte une disparité dans la gestion des sites contaminés entre les pays de l'union européenne. Par exemple, le recensement des sites pollués peut être un inventaire national dans certains pays, tandis que dans d'autres, la gestion des sites contaminés se fait au niveau régional. De plus, certains pays ne communiquent pas les inventaires de leurs sites contaminés à l'agence européenne pour l'environnement (Delafoulhouze, 2016).

En France, il n'y a pas de réglementation spécifique sur le sol. Les propriétaires de sites contaminés se réfèrent au code de l'environnement et en particulier à la réglementation des installations classées pour la protection de l'environnement pour la gestion de leurs sites (Code de l'environnement de la République française). Ce règlement exige que les propriétaires de sites contaminés les réhabilitent de sorte que les sites soient sans danger pour les activités futures. Toutefois, ce règlement ne fixe pas de teneurs maximales à respecter en termes de contaminants. Par conséquent, pour savoir si leurs sites sont conformes à la législation, les propriétaires se réfèrent par défaut à la législation sur les déchets et en particulier à un décret qui fixe des teneurs maximales pour certains contaminants dans le sol pour qu'ils soient admissibles dans les décharges pour déchets inertes (Ordre du 12 Décembre 2014, Journal officiel de la République Française). Malheureusement, parmi les molécules suivies dans les sols des sites contaminés, on trouve les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les PCB mais pas les PCDD/F (Delafoulhouze, 2016). Cette absence de réglementation qui fixerait des seuils à ne pas dépasser pour les PCDD/F dans les sols est compensé par les Valeurs de Constat d'Impact (VCI) permettant de constater l'impact de la

pollution de ce même milieu sol, selon la sensibilité de l'usage de celui-ci, sensible (résidentiel avec potager) et non sensible (industrielle). Les VCI représentent des valeurs cibles au-delà desquelles des études de risque doivent être mises en œuvre lorsqu'une réhabilitation des sols est envisagée. En France, les VCI des PCDD/F dans les sols sont représentées dans le tableau 4 (Syndicat Mixte de l'Arrondissement d'Avesnes., 2014).

Tableau 4 : Valeurs de Constat d'Impact (VCI) dans les sols en France

Pg.TEQ/g de matière sèche	VCI usage sensible	VCI usage non sensible
Sol cultivé	100	10 000
Sol non remanié	-	10 000

II. La phytoremédiation

II.1. Généralités

La phytoremédiation consiste en l'utilisation des plantes et des microorganismes qui leur sont associés pour contenir, biodégrader ou minéraliser les polluants du sol (Susarla et al., 2002; Pilon-Smits, 2005). Ces techniques douces peuvent s'appliquer *in situ* sur une large variété de sols pollués (sols agricoles, friches industrielles, sédiments excavés, etc.) en milieu rural et urbain. Jugées *a priori* plus conformes aux enjeux du développement durable que les techniques classiques de traitement sur site et hors site (excavation, désorption thermique, incinération, ...), elles impactent positivement les fonctions et la structure du sol. Ces techniques constituent une alternative ou un complément aux techniques conventionnelles dans le cas, notamment, de pollution sur de larges surfaces (Bert et al., 2012). Les différents mécanismes définissant le terme générique de "phytoremédiation" sont détaillés dans la Figure 2.

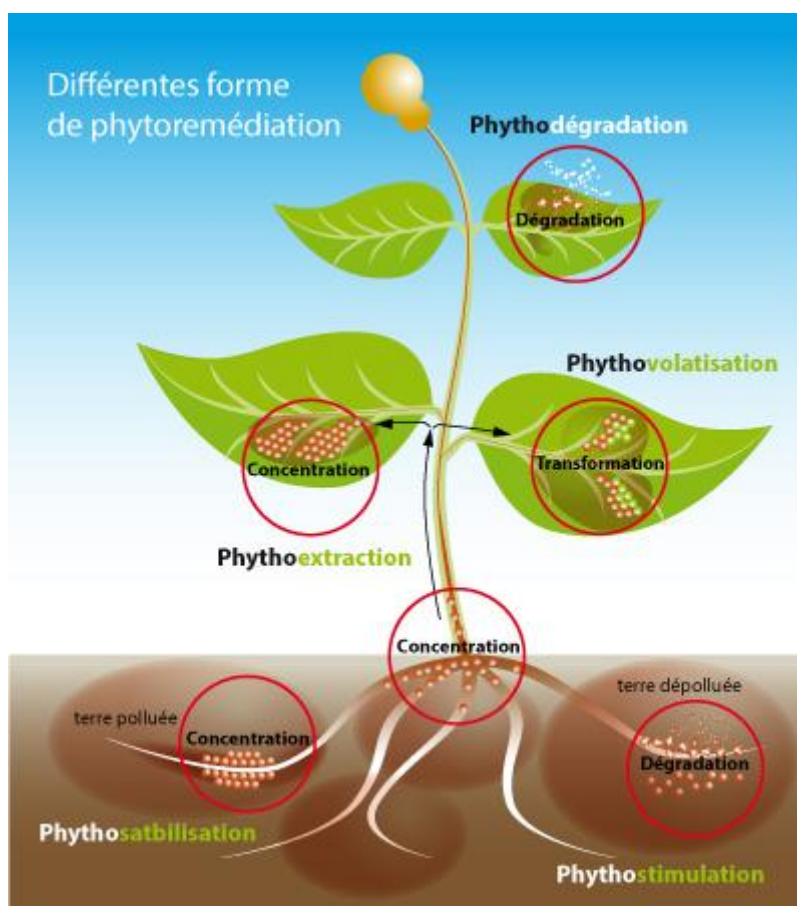


Figure 2 : Récapitulatif des différents processus de phytoremédiation (Thierry Guicherd, TGBlog <http://www.thierry-guicherd.fr/Blog/en/sciences/109-la-biotechnologie-vegetale-est-une-filiere-d-avenir>).

II.1.1. Phytostabilisation

La phytostabilisation n'est pas une technique de dépollution mais un mode de gestion des sites et sols pollués. Les plantes, éventuellement en combinaison avec des amendements (phytostabilisation aidée), empêchent ou limitent la mobilité des polluants *via* une stabilisation mécanique et (bio) chimique prévenant ainsi le transfert des polluants vers les différents compartiments de l'environnement et dans la chaîne alimentaire (Losi et al., 1994; Pradhan et al., 1998; Macek et al., 2000). Ce procédé tire avantage de la capacité qu'ont les plantes, au niveau des racines, à modifier les conditions environnementales du sol, tels que le pH et la teneur en humidité. Cette méthode est applicable dans le cas où la biodisponibilité des contaminants est réduite et concerne en particulier les polluants inorganiques.

II.1.2. La phytoextraction

Les plantes, *via* leurs racines, absorbent les polluants dans le sol et les transfèrent dans leurs parties aériennes (tiges, feuilles) où ils sont stockés. Cette méthode est principalement utilisée dans le cas de pollution métallique avec des plantes dites « hyperaccumulatrices » ou des plantes avec une biomasse importante, pouvant être ensuite valorisées (bois-énergie, compostage, éco-matériaux, méthanisation, biocarburants...) (Kumar et al., 1995; Brooks, 1997).

II.1.3. La phytodégradation

La phytodégradation désigne la dégradation des polluants organiques par la plante elle-même, à travers son activité métabolique, au niveau des parties aériennes et/ou racinaires (ce qui suppose alors l'absorption du polluant au préalable), ou en dehors de la plante *via* la production d'enzymes extra-racinaires (exsudats) (Shimp et al., 1993; Macek et al., 2000). Les plantes secrètent de nombreuses enzymes pouvant contribuer à la métabolisation des POP dans la rhizosphère. Cette détoxification se traduit par l'oxydation du contaminant suite à l'action de laccases, de peroxydases, de déhalogénases, de déhydrogénases, de nitroréductases, nitrilases, ainsi que des cytochromes P450 (Schnoor et al., 1995; Liste et Alexander, 2000).

II.1.4. La rhizodégradation ou phytostimulation

Elle correspond à la dégradation des polluants grâce à la stimulation de l'activité des micro-organismes localisés dans la région du sol directement formée et influencée par les racines (la rhizosphère). La plante fournit la source de carbone nécessaire à la croissance de la microflore rhizosphérique (bactéries, champignons saprotrophes) *via* son exsudation racinaire et permet l'aération du sol (Bert et al., 2012). Elle peut être mise en œuvre sur des sols industriels ou agricoles, éventuellement multi-contaminés, et s'applique à divers contaminants organiques tels que les solvants chlorés, les HAP, les PCB et les pesticides. Comme toutes les autres techniques de phytoremédiation, la principale contrainte reste la possibilité d'établir un couvert végétal conséquent et donc que le sol à traiter présente une fertilité suffisante, c'est-à-dire une ressource en eau disponible, la présence d'éléments nutritifs, une bonne structure du sol et une faible phytotoxicité (Sterckeman et al., 2012).

II.2. Phytoremédiation des sols pollués par les PCDD/F

Les plantes ont le potentiel de métaboliser certains polluants organiques par une voie qui comprend généralement trois étapes: l'activation, la conjugaison et la compartimentation. Cette voie implique des enzymes de détoxification tels que les cytochromes P450, les N-glucosyltransférases et les glutathion-S-transférases, réagissant avec les POP pour les rendre plus hydrophiles et permettre leurs stockages dans les vacuoles ou au sein des espaces intercellulaires (parois pectocellulosiques) (Coleman et al., 1997 ; Tissut et al., 2006). Cependant, le potentiel de détoxification des composés organochlorés tels que les PCB ou le PCDD/F par les plantes est fortement affecté par une capacité d'absorption limitée des plantes, en raison de la liaison forte de ces composés sur la matière organique du sol (Schäffner et al., 2002). Néanmoins, plusieurs études ont montré que certaines plantes notamment les cucurbitacées telles que les courgettes, les citrouilles et le melon, ont la capacité d'accumuler les PCDD/F dans leurs parties aériennes (Hülster et al., 1994 ; Campanella et Paul, 2000 ; Lunney et al., 2004; Zhang et al., 2009). Des taux de dissipation de l'ordre de 30%, ont été obtenus par phytoextraction sur des sols contaminés par des PCDD/F végétalisés par la courgette (Urbaniak et al., 2016).

Les preuves de métabolisation de composés organochlorés par les plantes sont relativement limitées et n'ont été obtenues que pour les PCB dans des conditions expérimentales très simplifiées notamment *in vitro* (Vergani et al., 2017). Par exemple, il a été montré que des racines transformées de tabac sont capables de métaboliser certains PCB en composés hydroxylés (Kucerova et al., 2000 ; Rezek et al., 2007). La connaissance des processus métaboliques impliqués dans ce métabolisme est encore limitée, même si des enzymes courantes comme les peroxydases et les cytochromes P450 sont probablement impliqués (Chroma et al., 2002). Wang et Oyaizu (2009) ont reporté la capacité du trèfle (*Trifolium repens* L.) à dissiper le dibenzofurane (DF) après deux mois de culture en sol stérile. De plus, ces mêmes auteurs décrivent une dissipation plus importante du DF dans un sol non-stérile végétalisé avec le trèfle, reliant cette dissipation à la fois à une phytodégradation du polluant par la plante et à une phytostimulation par le trèfle des populations bactériennes à capacité dégradante. La plupart des travaux décrits dans la littérature portent principalement sur la capacité des plantes à stimuler la dégradation des composés organochlorés, notamment les PCB, *via* l'action des communautés microbiennes du sol (c'est-à-dire la rhizodégradation, (Leigh et al., 2006; Slater et al., 2011 ; Li et al., 2013;

Secher et al., 2013) plutôt que d'éliminer directement les PCB du sol par phytodégradation. Néanmoins, il existe peu de travaux décrivant la rhizodégradation des PCDD/F.

Les plantes jouent un rôle important dans la promotion de la diffusion de l'oxygène et la régulation de l'eau du sol dans la rhizosphère (Schnoor et al., 1995). Les exsudats racinaires contiennent de nombreux composés susceptibles de modifier la structure des communautés microbiennes présentes (Reilley et al., 1996; Joner et al., 2001; Joner et Leyval, 2003) et de stimuler l'activité biodégradante microbienne de la rhizosphère (Binet et al., 2000 ; Joner et al., 2001). Aussi, des interactions complexes impliquant les racines, les exsudats racinaires, les sols rhizosphériques et les communautés microbiennes favoriseraient la dégradation des composés organochlorés en composés non toxiques ou moins toxiques, ce qui pourrait conduire à la remédiation des sols contaminés (Van Aken et al., 2010). Des composés libérés par des plantes comme les flavonoïdes et les terpènes peuvent par exemple, stimuler certaines communautés microbiennes impliquées dans la dégradation des PCB (Donnelly et al., 1994; Gilbert et Crowley 1997; Hernandez et al., 1997; Leigh et al., 2002).

II. 2.1. Phytoremédiation assistée

De nombreux obstacles peuvent entraver la remédiation des sols *via* les techniques de phytoremédiation comme la phytotoxicité de polluants ou leur faible biodisponibilité dans le sol. Par conséquent, la phytoremédiation peut être assistée par des traitements chimiques et/ou biologiques afin de surmonter ces limitations et d'améliorer l'efficacité de remédiation.

II.2.1.1. Phytoremédiation assistée par les CMA

Les CMA sont des champignons microscopiques omniprésents dans la plupart des sols naturels et anthropisés (Smith et Read, 2008). On estime que plus de 80% des plantes terrestres vivent en symbiose avec ces champignons (Bonfante et Perotto, 1995). Les hyphes des CMA se développent à l'intérieur de la racine formant des structures intracellulaires appelées arbuscules, site d'échange entre les deux partenaires symbiotiques, et des vésicules, organes de stockage riches en lipides (Figure 3).

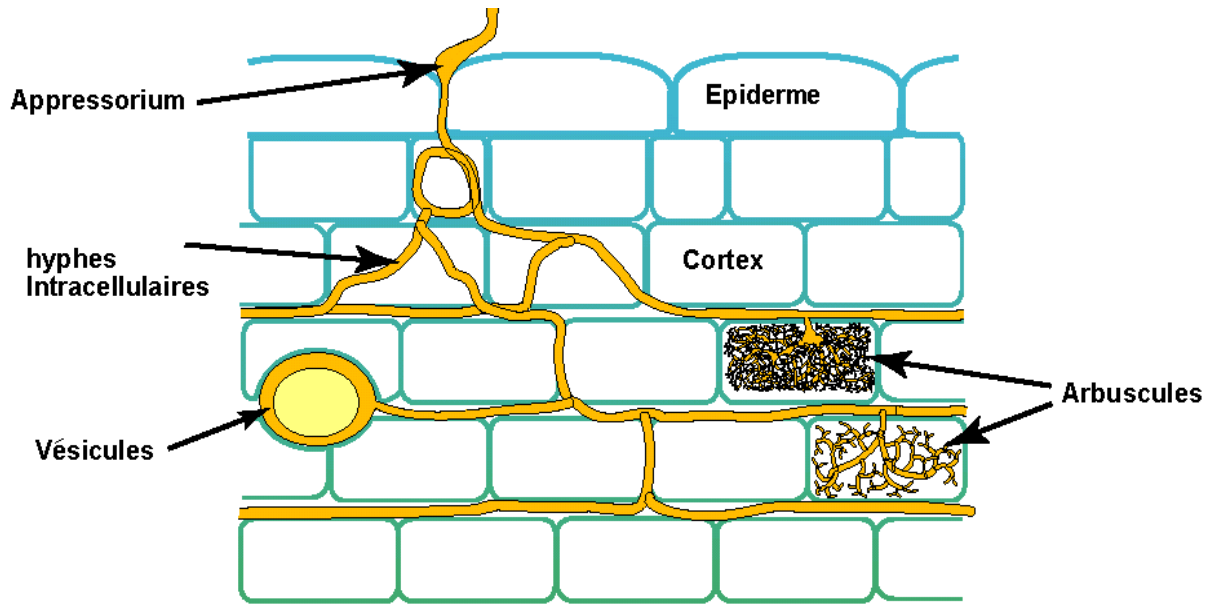


Figure 3 : Schéma des structures intra-racinaires de CMA (Brundrett, 2008).

Les mycorhizes à arbuscules constituent le type de mycorhizes le plus répandu et le plus ancien, qui auraient co-évolué avec les plantes terrestres depuis au moins 460 millions d'années (Redecker et al., 2000). Environ 230 espèces de CMA ont été recensées dans le monde (Oehl et al., 2011). Les CMA sont incapables de survivre sans plante hôte : ce sont des symbiontes obligatoires. Contrairement à d'autres champignons, ce sont des champignons aseptés faisant partie de l'ordre des Glomérales et du phylum des Glomeromycètes (Schüßler et al., 2001). Ils sont capables de coloniser une large variété de plantes, en majorité des herbacées et quelques espèces ligneuses (ex : Peuplier, Eucalyptus).

L'inoculation mycorhizienne arbusculaire peut augmenter l'efficacité de la phytoremédiation grâce à l'amélioration de la croissance des plantes et de leur résistance à la phytotoxicité des polluants, à l'augmentation de la capacité de biodégradation des polluants soit de façon directe par les racines associées aux hyphes mycorhiziens ou de façon indirecte par la stimulation des microorganismes rhizosphériques ainsi qu'à une meilleure absorption et bioaccumulation des polluants par les racines mycorhizées (Figure 4).

En effet, il est bien connu que les hyphes améliorent l'alimentation hydrique et minérale des plantes (Rajtor et Piotrowska-Seget, 2016). Rabie (2005) a évalué la teneur en eau dans les plantes cultivées dans un sol pollué. Il a constaté que l'introduction du CMA *Funneliformis mosseae* a facilité l'absorption de l'eau. Des augmentations des teneurs en eau jusqu'à 175% dans le blé (*Triticum aestivum* L.) et 200% dans le haricot mungo (*Vigna radiata* L.) par rapport aux plantes témoins non mycorhizées ont été montrées (Rabie, 2005). Les CMA

participent également à la stabilisation des agrégats du sol grâce à la production d'une glycoprotéine extracellulaire, la glomaline. Cette stabilité du sol permet de lutter contre l'érosion, la perte de nutriments et de la matière organique par lixiviation, entraînant ainsi une augmentation de la pénétration de l'air et de l'eau dans le sol. Ils augmentent ainsi considérablement la croissance de la plante. Plusieurs études montrent que l'introduction de CMA dans les sols contaminés a entraîné une augmentation de la biomasse végétale (Tchabi et al., 2010 ; Oehl et al., 2011 ; Wu et al., 2011; Yu et al., 2011; Trejo et al., 2013; Nwoko, 2014; Lu et Lu, 2015). La glomaline peut également influencer l'abondance des microorganismes. Rillig et al. (2001) ont montré que la glomaline peut augmenter de 12-fois la biomasse microbienne du sol. En outre, les hyphes non vivants constituent une source supplémentaire de carbone pour les microorganismes (Toljander et al., 2007). Récemment, il a été montré que la glomaline accroît la disponibilité des POP, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans le sol et favorise ainsi leur dégradation (Gao et al., 2017). Les CMA participent aussi à l'augmentation de carbone organique dissous au-delà de la rhizosphère et stimule ainsi le développement et l'activité enzymatique des microorganismes dégradant des polluants organiques (Rajtor et Piotrowska-Seget, 2016).

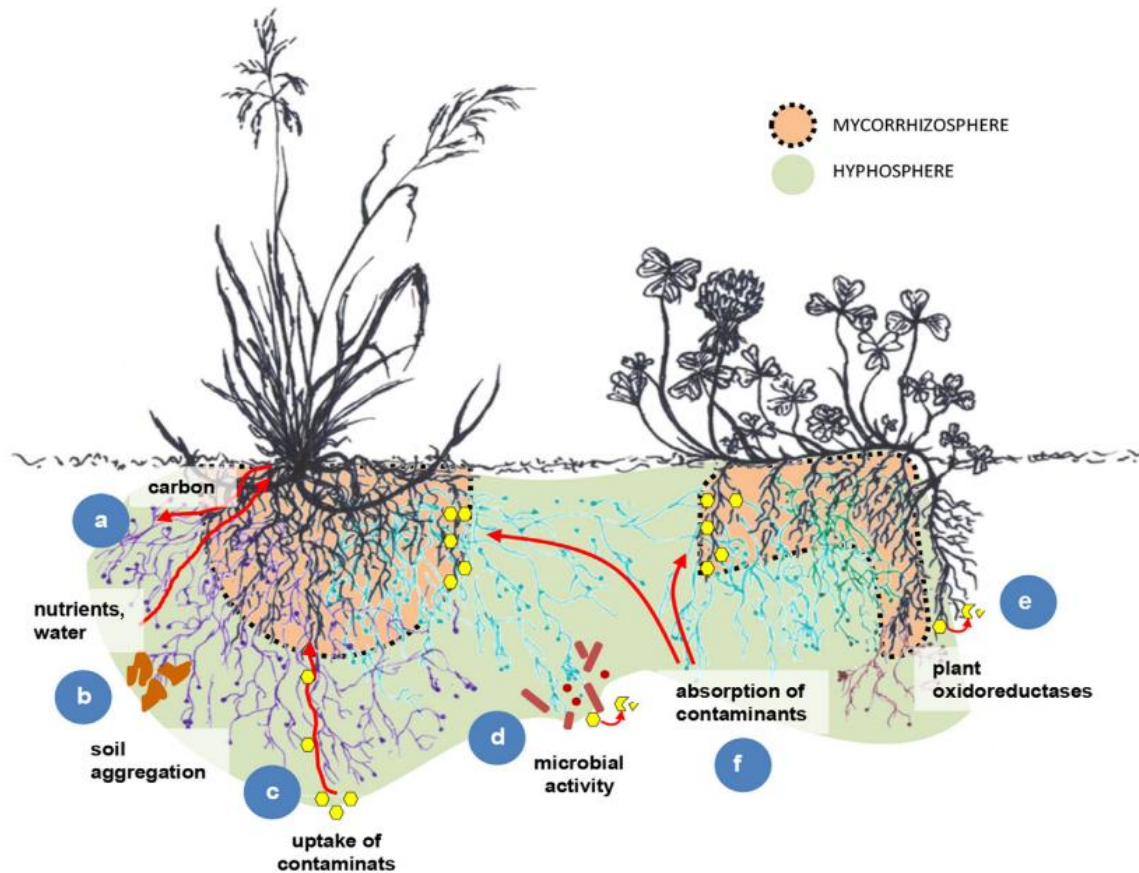


Figure 4 : Implication des champignons mycorhiziens arbusculaires dans la phytoremédiation du sol contaminé par des hydrocarbures (Rajtor, Piotrowska-Seget, 2016).

Les CMA ont également un effet protecteur contre les stress abiotiques (sécheresse, salinité, alcalinité et pollution) (Ruiz-Lozano, 2003) grâce à une amélioration de la nutrition minérale et hydrique de la plante mais aussi à une atténuation du stress oxydant induit par la présence des polluants (Zhang et al., 2006). En effet, les travaux de Debiane et al. (2008, 2009), réalisés au sein de notre laboratoire, ont reporté que la mycorhization protégeait la plante en atténuant le stress oxydant induit par les HAP. Ces travaux ont montré que les racines mycorhizées présentaient des teneurs plus faibles de marqueurs d'altération membranaire (comme le malondialdéhyde) et génomique (comme la 8-Hydroxy-2'-deoxy-guanosine) par comparaison aux racines non mycorhizées. Ce qui s'explique par une induction de certaines activités enzymatiques antioxydantes comme la superoxyde dismutase, la catalase ou les peroxydases qui sont à l'origine de l'élimination des espèces réactives de l'oxygène. Lenoir et al. (2017) ont montré que les racines mycorhizées accumulaient moins de peroxyde d'hydrogène que des racines de plantes non-mycorhizées cultivées en présence de HAP. Les CMA peuvent ainsi favoriser l'établissement et la survie des plantes sur les sols contaminés par les POP (Gao et al., 2010).

Les CMA contribuent également à protéger les plantes contre divers agents pathogènes (Dalpé, 2005 ; Oehl et al., 2011 ; Mustafa et al., 2016, Comby et al., 2017). Les mécanismes impliqués dans la protection de la plante contre différents pathogènes sont variés tels qu'une compétition pour la colonisation des racines et pour l'absorption des nutriments, une stimulation des réactions de défense de la plante par le CMA ou une action directe de composés fongiques sécrétés par la CMA et capables de perturber le développement des pathogènes (Dalpé, 2005).

Différents travaux ont montré l'apport des CMA dans de la biodégradation des polluants organiques (Lenoir et al., 2016). Celui-ci résulterait de deux processus: (i) la modification du métabolisme de la plante : par exemple une augmentation de l'activité enzymatique peroxydase au niveau des racines mycorhizées (Criquet et al., 2000), (ii) la modification et/ou la stimulation des populations microbiennes à capacité dégradante de la rhizosphère suite à une modification de l'exsudation racinaire (Joner et Leyval, 2003a) ou à la présence des hyphes extraracinaires dans le sol (Qin et al., 2016). En effet, les hyphes extraracinaires des CMA peuvent être utilisés directement comme substrat par certaines espèces bactériennes (Toljander et al., 2007) ou libèrent dans le sol des molécules carbonées (Hooker et al., 2007; Toljander et al., 2007) ou de l'acide citrique (Tawaraya et al., 2006), susceptibles de modifier

les communautés microbiennes du sol. Quelques travaux ont décrit l'apport de l'inoculation mycorhizienne dans la dissipation des composés organochlorés tels que les PCB. Ainsi, les inoculations des plants de courgette par *Funneliformis mosseae* et du raygrass par *Funneliformis caledoniun* ont favoriser la dissipation des PCB (Qin et al., 2014 ; Lu et al., 2014). Teng et al. (2010) ont montré que l'inoculation de la luzerne par *Glomus caledonium* associé à une bactérie fixatrice d'azote, *Rhizobium meliloti*, a permis l'élimination de 43,5% des PCB dans le sol contre 8,1% avec de la luzerne non inoculée.

II.2.1.2. Phytoremédiation assistée par l'ajout de biosurfactants

Les surfactants sont des molécules amphiphiles qui réduisent la tension superficielle aqueuse et augmentent la solubilité des composés organiques, améliorant ainsi les processus naturels de biodégradation (Laha et al., 2009). Différentes catégories de tensio-actifs sont connues, (i) les cationiques qui possèdent une charge positive susceptibles de s'adsorber plus facilement aux particules du sol; (ii) les anioniques s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement, (iii) les non ioniques (sans charge) et (iv) les amphotères possédant deux groupements différents (1 cationique et 1 anionique) (West et Harwell 1992). Les surfactants d'origine biologique (ou biosurfactants) ont le plus souvent un caractère non ionique ou anionique, ce qui les rend moins sensibles à la sorption sur les sols. L'utilisation de surfactants dans le cadre de la remédiation des sols, dont par exemple les rhamnolipides, les surfactines et les subtilines, vise à favoriser la désorption des polluants et donc d'accroître leur biodisponibilité dans les sols (Zhang et al., 2010). Des études antérieures décrivent l'usage d'agents tensioactifs comme une méthode efficace pour la remédiation des sols contaminés (Volkering et al., 1995 ; Rahman et al., 2002). Le recours à l'utilisation des biosurfactants présente de nombreux avantages, au regard de leurs homologues issus souvent de la pétrochimie. En effet, contrairement à ces produits de synthèse qui présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables (Parra et al., 1989 ; Healy et al., 1996 ; Page et al., 1999 ; Vipulanandan et Ren, 2000), les biosurfactants produits par des microorganismes, des plantes ou des animaux sont considérés comme des agents très prometteurs pour améliorer la bioremédiation en raison de leur biodégradabilité et de leur toxicité relativement faible (Poremba et al., 1991). Ces biosurfactants sont constitués d'une partie hydrophile polaire (acides aminés, peptides ou de polysaccharides) et d'une partie hydrophobe non polaire (acides gras saturés ou non saturés) (Desai et Banat, 1997). Les organismes microbiens qui produisent les biosurfactants sont, par exemple, *Bacillus subtilis*, *Rhodococcus* spp. et *Pseudomonas aeruginosa* (Franzetti et al., 2010, Figure 5). L'application

de biosurfactants et/ou de microorganismes producteurs de biosurfactants dans les études *in situ* indique que les biosurfactants sont plus efficaces que les tensioactifs synthétiques dans la biodégradation des contaminants organiques (Le Floch et al., 1999, Straube et al., 1999; Mulligan, 2005). Les biosurfactants ont des concentrations micellaires critiques inférieures à leurs homologues chimiques, ce qui les rend donc efficaces à de plus faibles concentrations (Gabet. 2004). Ces molécules peuvent être ajoutées directement par pulvérisation, injection, ou indirectement en introduisant les microorganismes producteurs de biosurfactants, ce qui semble particulièrement prometteur en cas de traitements *in situ*. Les résultats obtenus par Manickam et al. (2012) montrent que l'ajout de rhamnolipides améliore la biodégradation des hexachlorocyclohexane dans le sol de 40% en présence de la bactérie *Sphingomonas* sp. Plus récemment, Liao et al. (2016) ont montré, dans une expérimentation en pots, que deux types de biosurfactants (les rhamnolipides et la lécithine de soja) entraînaient une élimination accrue des hydrocarbures totaux. La co-inoculation du maïs avec *B. subtilis* BS1 et *Glomus etunicatum* a conduit à une diminution importante des concentrations résiduelles de phénanthrène dans le sol, en parallèle de l'augmentation des activités de catalase et polyphénol oxydase mesurées au niveau des sols. Par conséquent, l'inoculation d'une souche produisant des biosurfactants dans la rhizosphère pourrait être une approche biotechnologique potentielle pour la remédiation des sols.

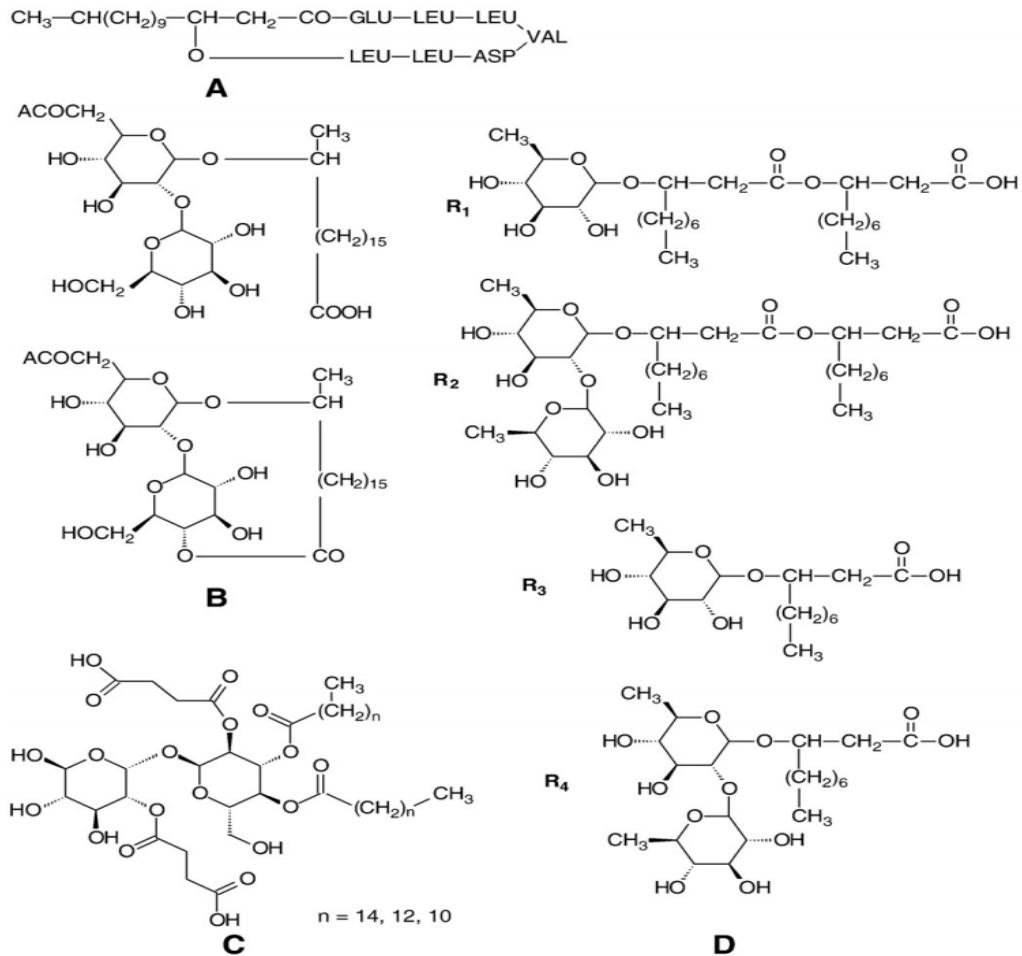


Figure 5: Structure moléculaire de biosurfactants (A) surfactines produites par *Bacillus subtilis*, (B) sophorolipides produits par *Candida bombicola*, (C) succinoyltréhalose lipidique produit par *Rhodococcus erythropolis*, (D) rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* (Delort et al., 2010).

II.2.1.3. Introduction des microorganismes à capacité dégradante

La dégradation microbienne est le principal mécanisme conduisant à une diminution de la pollution dans l'environnement, *via* une transformation en composés intermédiaires (métabolites) ou une minéralisation complète en carbone inorganique (CO₂) (Peng et al., 2008). La microflore dégradante peut être absente ou sa densité insuffisante, il est donc parfois nécessaire d'apporter des microorganismes connus pour leur capacité métabolique des polluants. Dans une étude de Wang et Oyaizu. (2011), la capacité dégradante de la souche *Comamonas* sp. KD7, qui a fait l'hypothèse de former un biofilm à la surface des racines de trèfle a été étudiée. A cette fin, le sol a été enrichi avec 20 mg/kg de 28-DCDF, 1-CDD, 27-DCDD, 124-TCDD et 1234-TeCDD et 1000 mg/kg et DF. 4 conditions ont été testées, (1) sol

non végétalisé et non inoculé avec KD7, (2) sol non végétalisé et inoculé avec KD7, (3) sol végétalisé avec le trèfle et non inoculé avec KD7 et (4) sol végétalisé avec le trèfle et inoculé avec KD7. Les résultats ont révélés une diminution significatives du DF (63%) dans un sol non végétalisé et inoculé par KD7 par rapport au sol non végétalisé et non inoculé après 12 semaines de cultures. Le trèfle inoculé avec la souche KD7 a permis d’obtenir des réductions importantes de 43% pour les DF, de 68% pour les 28-DCDF et de 58% pour les DD.

III. Biodégradation des PCDD/F par les microorganismes du sol

III.1. Généralités

La dégradation microbienne des PCDD/F s’effectue selon deux voies : les congénères fortement chlorés peuvent subir une déchloration en condition anaérobie tandis que les autres subissent généralement une oxydation par des bactéries ou des champignons saprotrophes en aérobiose. L’efficacité de biodégradation dépend de plusieurs paramètres dont la concentration et la biodisponibilité des polluants, les conditions physico-chimiques (teneur en oxygène, température, intensité lumineuse, pH, conductivité) et les structures des communautés microbiennes du sol (Urbaniak et al., 2013).

III.2. Dégradation des PCDD/F en condition aérobie

III.2.1. Implication des bactéries

La biodégradation en aérobie des PCDD/F a largement été décrite au cours de ces 30 dernières années (Klecka et Gibson 1980 ; De Vito et Birnbaum 1994 ; Wilkes et al., 1996 ; Schreiner et al., 1997). En général, la biodégradabilité des PCDD en condition aérobie décroît avec le nombre d’atomes de chlore porté par les congénères. Ainsi, 84% des études décrivant la dégradation aérobie des PCDD/F concernent les congénères mono et di-chlorés (Field et Sierra-Alvarez, 2008).

D’après Field et Sierra-Alvarez (2008), il existe peu d’exemples décrivant la biodégradation de PCDD/F comme unique source de carbone. Néanmoins, Hong et ses collègues (2004) ont démontré l’utilisation du mono-CDD et du di-CDD comme seule source d’énergie pour la croissance de *Pseudomonas veronii* PH-03. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant *Sphingomonas wittichii* RW1 en présence de tri-CDF et tétra-CDF (Arfmann et al., 1997, Wittich et al., 1999).

La dégradation bactérienne en condition aérobie a lieu préférentiellement *via* un co-métabolisme pour lequel le polluant ne représente pas la source de carbone principalement utilisée pour la croissance du microorganisme (Field et Sierra-Alvarez, 2008). Le composé le plus souvent utilisé est un analogue non halogéné des furanes, le DF (Parsons et Storms., 1989), mais d'autres molécules comme le carbazole (Habe et al., 2002), le o-dichlorobenzène (Du et al., 2001), l'acide benzoïque ou l'acide 3-méthoxybenzoïque (Habe et al., 2002) peuvent être également utilisés. Ces substrats induisent des dioxygénases qui sont impliquées dans la dégradation des PCDD/F. La voie de biodégradation des PCDD/F la plus commune en condition aérobie est représentée dans la figure 6.

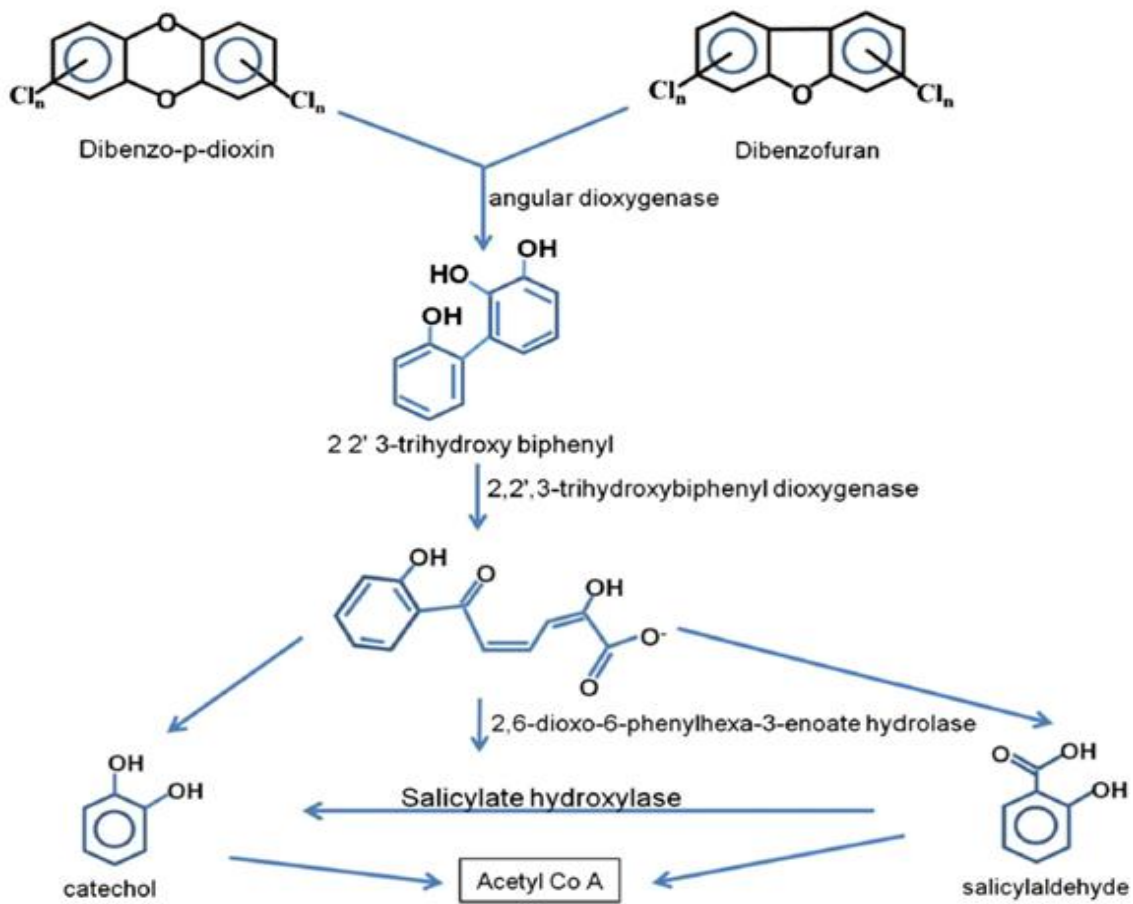


Figure 6 : La voie de biodégradation catabolique de la dibenzo-p-dioxine et du dibenzofurane (Chakraborty et Das 2016)

Certaines bactéries sont capables d'oxyder les PCDD/F grâce à l'action d'une dioxygénase angulaire hydrolysant simultanément le carbone portant une liaison éther (C-O)

et un carbone non substitué adjacent à cette liaison (atome de carbone situé en position angulaire) (Parsons et Storms, 1989 ; Wilkes et al., 1996 ; Schreiner et al., 1997 ; Keim et al., 1999). Cette enzyme catalyse la formation de diols formant le 2,2', 3-trihydroxybiphényle chloré. Le cycle hydroxylé est ensuite oxydé par des dioxygénases et les produits ouverts en anneau sont métabolisés, ce qui donne du catéchol chloré et des salicylates chlorés à partir de PCDD et de PCDF respectivement. Les PCDF portant des chlores sur les deux cycles aboutissent à la formation de 2-méthyl-4H-chroman-4-ones chlorés (Keim et al., 1999; Fukuda et al., 2002). Plus spécifiquement, les dioxygénases de certaines espèces bactériennes telles que *Beijerinckia* sp. et *Alcaligenes* sp. provoquent une désoxygénation en position latérale, ce qui conduit à la formation du dihydrodiol et du dihydroxy-2-CDD (Klecka et Gibson 1980; Parsons et Storms 1989). De même, les cytochromes P450 de *Bacillus megaterium* provoquent une monooxygénation du 23-DCDD et 237-TCDD, qui conduit à la formation de ces métabolites hydroxylés (Sulistyaningdyah et al., 2004).

Les différents genres bactériens fréquemment décrits pour leurs aptitudes à dégrader les PCDD/F sont *Rhodococcus* (Actinobacteria), *Beijerinckia*, *Sphingomonas*, *Brevundimonas* (Alphaproteobacteria), *Bacillus* (Bacilli), *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Ralstonia* (Betaproteobacteria) et *Klebsiella*, *Lysobacter*, *Pseudomonas* et *Pseudoxanthomonas* (Gammaproteobacteria) (Schreiner et al., 1997 ; Habe et al., 2001, 2002 ; Du et al., 2001 ; Hong et al., 2002 ; Sulistyaningdyah et al., 2004 ; Nam et al., 2006 ; Chen et al., 2013). Une des espèces aérobies les mieux caractérisées pour le catabolisme des PCDD/F est *S. wittichii* RW1 isolée d'une rivière contaminée par les PCDD/F en Allemagne (Wittich et al., 1992). Cette souche bactérienne a la capacité de dégrader des congénères hautement chlorés (Bunge et al., 2008) bien que celle-ci dégrade préférentiellement des composés portant un nombre de chlore inférieurs à 4 (Nam et al., 2006).

Lin et al. (2013) ont obtenu 98% de dégradation des OCDF et OCDD à partir de sol en condition aérobie dans un réacteur en présence de *Pseudomonas mendocina* NSYSU. De même, Chen et al (2013) ont pu observer la dégradation de 99,9% de dégradation de l'OCDF et 97,75% de l'HpCDF par les microorganismes indigènes au sein d'un sol oxygéné et amendé avec des nutriments après 6 semaines d'incubation. Néanmoins, aucune dégradation de l'OCDD n'a pu être observée après 12 semaines d'incubation dans les mêmes conditions (Chen et al 2013).

III.2.2. Implication des champignons saprotrophes

Les champignons de la pourriture blanche ou «White rot fungi» ainsi que certaines espèces non ligninolytiques peuvent être impliqués dans la dégradation des composés chlorés comme les PCDD/F.

En effet, les champignons de la pourriture blanche sont capables de dégrader la lignine mais aussi une variété de polluants xénobiotiques grâce à la libération d'enzymes oxydantes telles que les peroxydases (manganèse peroxydases et lignine peroxydases) dans le milieu extracellulaire (Field et al., 1993). Plusieurs mécanismes oxydatifs, responsables de la dégradation des PCDD/F, ont été caractérisés chez les champignons *via* les activités de cytochrome P-450, de lignine peroxydase, de manganèse peroxydase ou de laccase (Chang, 2008). *Phanerochaete chrysosporium* (Agaricomycetes) a été rapporté comme un champignon capable de dégrader les PCDD/F (Covino et al., 2016). Une minéralisation de 2,2% de [¹⁴C] -2378-TeCDD a été observée après 30 jours de culture en présence de *P. chrysosporium* (Bumpus et al., 1985). Ce champignon a également été utilisé avec succès pour dégrader le congénère 27-DCDD (Valli et al., 1992). Néanmoins, l'activité de biodégradation de ces champignons ne se limite pas aux congénères faiblement chlorés. Il a été montré que *P. chrysosporium* est capable d'éliminer 34% d'un mélange de congénères contenant de 5 à 8 atomes de chlore après 7 jours d'incubation et 48% après 14 jours dans un milieu synthétique (Takada et al., 1996). *Phanerochaete sordida* YK-624, cultivé en condition de laboratoire, a permis la dégradation de 40% de 2378-TCDD, 76% d'OCDD, 45% de 2378-TCDF et 70% d'OCDF après 14 jours d'incubation (Takada et al., 1996). Une autre espèce de moisissure ligninolytique, *Phlebia lindtner* a permis de dégrader 87 et 66% de dibenzo-p-dioxine et DF respectivement en 24 heures et 100% des deux contaminants en 120 heures (Mori et Kondo, 2002).

La biodégradation des PCCD/F par les champignons de la pourriture blanche est représentée dans la figure 7. Celle-ci repose sur l'action des manganèse peroxydases et lignine peroxydases permettant l'oxydation des PCDD/F et la formation de quinones qui seront réduites en hydroquinones ou en catéchols et/ou méthylés en méthoxybenzènes.

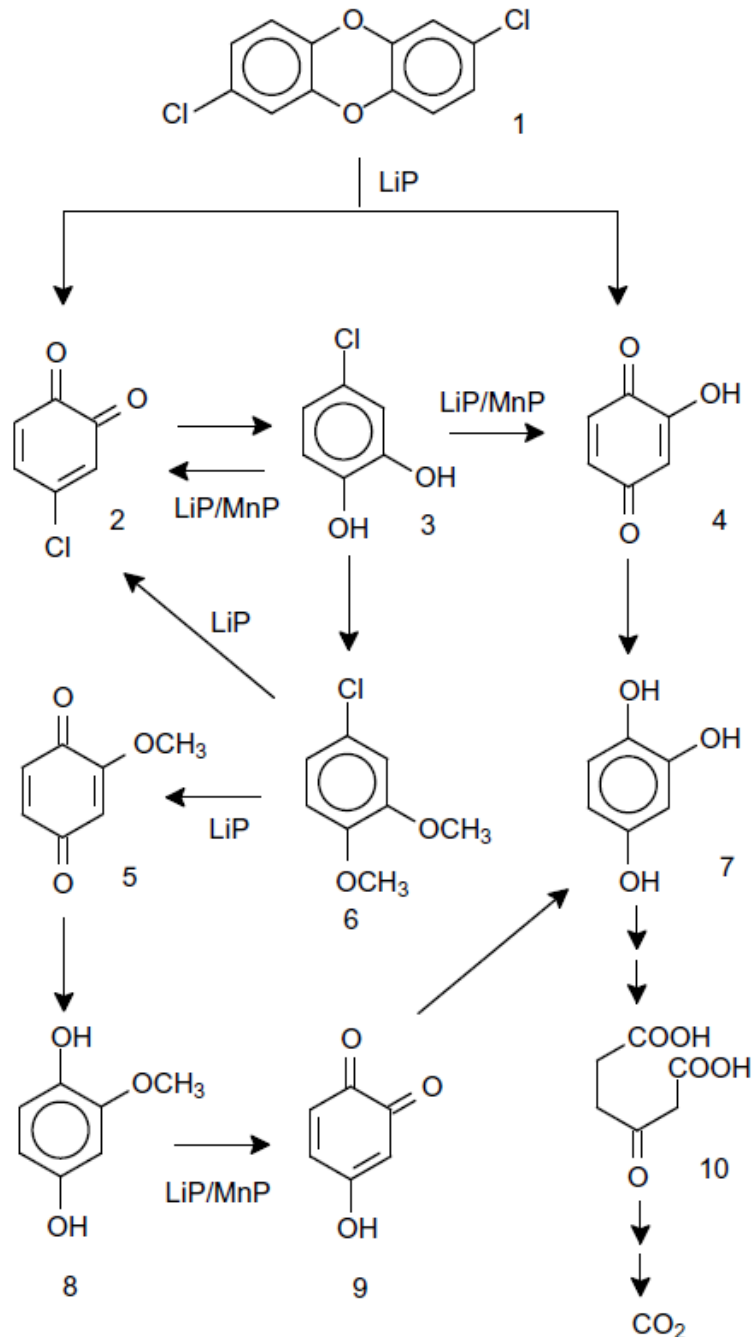


Figure 7 : Voie de dégradation de 27-dichlorobenzo-p-dioxine (27-DCDD) par un champignon de la pourriture blanche : *Phanerochaete chrysosporium* (Valli et al., 1992).

Légende : 27-DCDD (1), 4-chloro-1,2-benzoquinone (2), 4-chlorocatechol (3), 2-hydroxy-1,4-benzoquinone (4), 2-methoxy-1,4-benzoquinone (5), 4-chloroveratrole (6), 1,2,4-trihydroxybenzene (7), 2-méthoxyhydroquinone

(8), 4-hydroxy-1,2-benzoquinone (9), acide beta-ketoadipique (10), lignine peroxydase (LiP), manganèse peroxydase (MnP).

Anasonaye et al. (2014) ont observé la dégradation de 65% d'un congénère hautement chlorés, le 1234678-HpCDF par *Stropharie rugosoannulata*, et une diminution de 64% de la valeur TEQ en 3 mois dans le sol. Valentín et al. (2013) ont obtenu 14% de dégradation de 1234678-HpCDF dans un sol amendé en *S. rugosoannulata* après 15 semaines d'incubation. De plus, Kamei et al. (2009) ont obtenu 50% de dégradation du 1368-TCDD avec *Phlebia brevispora* après 12 semaines.

La dégradation des PCDD par les champignons non-ligninolytiques se limite à quelques genres appartenant à l'embranchement des Ascomycètes et pour lesquels les mécanismes de dégradation restent encore inconnus (Marco-Urrea et al., 2015). *Pseudallescheria boydii* (Sordariomycetes) est capable de dégrader 82% d'un mélange de PCDD/F tétra et octachlorés en présence de glucose comme source principale de carbone (Nakamiya et al., 2002). Les mêmes taux de dégradation ont été obtenus pour la 237-TrCDD et l'OCDD en présence de glucose ou de 1,4-dioxane avec *Cordyceps sinensis* (Nakamiya et al., 2005).

III.3. Dégradation des PCDD/F en conditions d'anaérobies

La déchloration réductrice (ou déshalogénéation réductrice) est une réaction d'oxydo-réduction qui se déroule en absence d'oxygène et au cours de laquelle le composé chloré perd un groupement halogène et accepte deux électrons selon la réaction suivante : $RCl + H^+ + 2e^- = RH + Cl^-$ (Hiraishi, 2008 ; Popat et Deshusses, 2011). Les bactéries impliquées dans ce processus sont capables de transformer les PCDD les plus chlorés (> 4 atomes de chlore) en composés moins toxiques, portant un nombre réduit de chlore (< 4 atomes de chlores). Ainsi, la déchloration réductrice pourrait être l'un des rares mécanismes permettant la réduction de la toxicité des PCDD/F polychlorés et ouvrant la voie à une décomposition ultérieure du squelette carboné. L'une des premières mises en évidence de déchloration réductrice des PCDD par les bactéries a été obtenue en condition anaérobie dans des sédiments dopés avec des congénères fortement chlorés (1234678-HpCDD, 1234678-HpCDF, 123478-HCDD et 12468-PeCDF) (Adriaens et Grbic-Galic, 1994). De nombreuses souches bactériennes déhalospirantes ont été identifiées et appartiennent notamment aux phylums Chloroflexi (Dehalococcoides) et Firmicutes (Dehalobacter, Desulfitobacterium) (Smidt et de Vos, 2004; Hiraishi, 2008). De même, la dégradation de 19 à 56% de congénères fortement chlorés,

comme les composés HpCDD, HxCDD et PeCDD, a été reporté dans les sédiments par Tanaka et al. (1996). Enfin, Bakovskii et al. (1998) ont également reporté la déchloration de l'OCDD (8 atomes de chlore) en composés portant 1 à 3 atomes de chlore dans des sédiments.

Selon les espèces bactériennes impliquées, différentes voies de déshalogénéation réductrice ont été décrites à partir d'une molécule modèle, la 1234-TeCDD (Figure 8). La déchloration initiale est soit observée dans une position latérale formant la 124-TCDD avec *Dehalococcoides ethenogenes* souche 195 (Fennell et al., 2004), soit en position *péri* formant la 123-TCDD avec *Dehalococcoides* sp. souche CBDB1 (Bunge et al., 2003). Ces produits peuvent à leur tour subir des déchloration par les mêmes bactéries pour aboutir à la formation de la 2CDD.

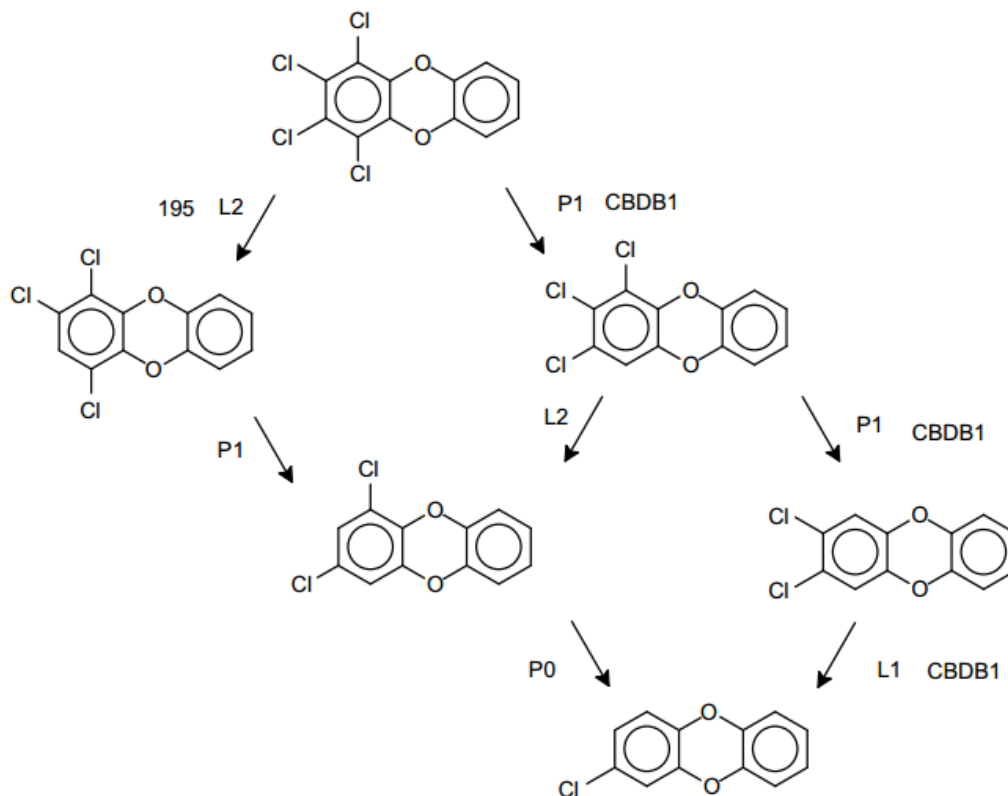


Figure 8 : Voie de biotransformation anaérobie de 1234-TeCDD dans les sédiments avec des cultures pures de *Dehalococcoides* spp. Déchloration latérale avec 1 chlore vicinal (L1) ou 2 chlores vicinaux (L2); Déchloration latérale adjacente avec 1 chlore vicinal (L1); Peri-déchloration adjacente avec un chlore vicinal (P1); Peri-déchloration sans chlore vicinal (P0); Réactions prédominantes de déchloration effectuées par *Dehalococcoides* sp. CBDB1 (CDDDB1); Réactions prédominantes de déchloration effectuées par la souche 195 de *Dehalococcoides Ethenogenes* (Fennell et al., 2004).

IV. La biodiversité des communautés microbiennes du sol

La rhizosphère est la couche mince du sol où les racines et les organismes du sol interagissent entre eux par de multiples façons (Richter et al., 2007). Les microorganismes du sol regroupent les bactéries, les Archées et les champignons (Bertrand et al., 2012). Les bactéries et les champignons sont des acteurs essentiels du bon fonctionnement des sols et constituent une communauté microbienne capable de s'adapter aux variations de son environnement, qu'elles soient d'ordre pédoclimatique, biologique ou anthropique (Bourceret. 2016). La biomasse microbienne et l'abondance relative des différents phyla dans les sols varient en fonction de la texture du sol (Ranjard et al., 2000), de la profondeur (Fierer et al., 2003), des paramètres édaphiques tels que le pH et la teneur en matière organique (Fierer et Jackson 2006; Lauber et al., 2009), de l'usage du sol, et de la présence de végétation (Berg et Smalla 2009). En utilisant la PCR quantitative, le nombre moyen des bactéries et des champignons dans les sols a été estimé à 10^8 et 10^3 copies de gènes par gramme de sol, respectivement (Rousk et al., 2010). Les communautés microbiennes dans les sols sont principalement constituées des phyla bactériens Proteobacteria, Acidobacteria et Actinobacteria (Janssen, 2006; Fierer et al., 2007) et des phyla fongiques Ascomycota et Basidiomycota (Buée et al., 2009 ; Klaubauf et al., 2010). Plusieurs facteurs anthropiques dont la pollution peuvent modifier l'activité, la densité et la structure des communautés microbiennes (Yang et al., 2014; Gołębiewski et al., 2014).

IV.1. Facteurs influençant la composition des communautés microbiennes du sol

L'écosystème sol est soumis en permanence à des perturbations qui vont impacter la structure de ses communautés microbiennes et donc leur évolution dans le temps. Il n'est pas encore possible aujourd'hui de prendre en compte tous les paramètres influant la composition de la microflore tellurique et surtout leurs interactions qui confèrent un nombre important de conditions différentes (Tarlera et al., 2008). Cependant, de nombreux travaux ont étudié divers facteurs influençant la structure des communautés microbiennes, qu'il s'agisse de facteurs de type abiotiques comme la température ou la présence de polluants dans le sol ou biotiques (végétation) (Hassink, 1993 ; Borneman et al., 1996 ; Borneman et Triplett, 1997).

IV.1.1. Facteurs abiotiques

La structure et la composition des communautés microbiennes sont modulées par de nombreux facteurs abiotiques. Par exemple, Rasche et al. (2011) ont rapporté que les variations de température et d'humidité dans un sol forestier en condition tempérée influençaient la disponibilité des ressources en azote et en carbone, modulant ainsi en particulier une adaptation des Acidobacteria. Selon Zhang et al. (2013), l'humidité du sol est un paramètre majeur impactant la diversité bactérienne, notamment celle des Proteobacteria. La structure des communautés fongiques est également impactée par les variations des conditions climatiques au cours des saisons avec des hivers froids et des étés relativement chauds (Davey et al., 2012).

La disponibilité des nutriments impacte l'abondance des différents groupes taxonomiques dans les sols (Fierer et al., 2007). En effet, les bactéries oligotrophes, tels que les Acidobacteria, présentent une croissance lente permettant de s'adapter aux milieux pauvres en nutriments. A l'inverse, les bactéries copiotrophes, comme les Betaproteobacteria et les Bacteroidetes, qui ont des besoins nutritifs importants, se développeront difficilement dans un milieu appauvri, mais connaîtront un développement rapide dans un milieu riche (Fierer et al., 2007). Ces variations de ressources en nutriments apparaissent également en fonction de la profondeur du sol. La profondeur induirait une spatialisation des communautés microbiennes dans le sol. En effet, l'abondance, la composition et la diversité des communautés bactériennes et fongiques varieraient suivant les horizons du sol. Un horizon riche en matière organique de surface favoriseraient les phyla impliqués dans la dégradation de la matière organique et l'horizon minéral plus en profondeur, favoriseraient les espèces oligotrophes (Bourceret. 2016).

Le pH est également un facteur important car il est relié plus ou moins directement à certaines fonctions et caractéristiques du sol, telles que la biodisponibilité des nutriments et la solubilité des métaux (Brady et Weil 2010). Les variations de pH peuvent imposer certaines contraintes physiologiques aux microorganismes, et notamment provoquer un état de stress dans le cas de pH extrêmes favorisant ainsi le développement de certains taxons capables de s'adapter à ces conditions aux dépens d'autres dont la croissance est inhibée. Bien que certaines bactéries aient la capacité de se développer à des pH extrêmes, la plupart croît à des pH autour de la neutralité, dans une gamme allant de 5 à 8 unités pH (Bertrand et al., 2012)

contre une gamme de 5 à 9 pour les champignons qui sont moins sensibles à ces variations (Lauber et al., 2009; Fierer et al., 2009; Rousk et al., 2010).

La contamination d'un sol, par des éléments traces métalliques (Gans et al., 2005) ou des polluants organiques (Yang et al., 2014; Bell et al., 2014) conduisent à court terme à une diminution de la diversité (nombre d'individus des différentes espèces) et de la richesse (nombre d'espèces différentes) microbiennes. Giller et al. (2009) ont montré que la toxicité des éléments traces métalliques sur les populations microbiennes entraîne une diminution de la diversité des populations sensibles et une augmentation de la diversité des populations résistantes à cette pollution. D'après Iffis et al. (2016) la concentration des hydrocarbures pétroliers affecte significativement les communautés bactériennes et fongiques saprotrophes associées aux CMA. A plus long terme, la toxicité de l'environnement induit au sein des communautés microbiennes la sélection de populations capables de survivre (tolérance aux pollutions), voir potentiellement capables de transformer les pollutions organiques (Yang et al., 2014) ou les polluants métalliques (Gołbiewski et al., 2014; Poirel et al., 2013). D'après les travaux de Bourceret et al. (2016), la richesse et la diversité des espèces bactériennes et fongiques dans des sols historiquement pollués par les HAP ont été augmentées en fonctions du temps, suggérant une adaptation des populations microbiennes à cette pollution au cours des décennies écoulées. Un enrichissement en Archées, dont les groupes strictement anaérobies tels que les *Clostridia*, a été montré dans les sols pollués par le diesel (Sutton et al., 2013) et suggèrent que ces populations sont capables de croître dans des conditions drastiques de pollution avec une concentration supérieure à 20 000 mg/kg. Yang et al. (2014) et Sawulski et al. (2014) ont montré que la pollution aux hydrocarbures diminuait la diversité des communautés bactériennes, fongiques et archéennes et favorisait les *Gammaproteobacteria* et *Bacteroidetes*. Ce phénomène s'explique par une toxicité importante de ces polluants, exerçant alors une pression de sélection sur les écosystèmes. Ainsi les classes des *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* et les *Proteobacteria* ont été détectées de façon majoritaire dans un sol contaminé par les PCDD/F (Yoshida et al., 2005).

IV.1.2. Facteurs biotiques

Les plantes peuvent avoir un impact identique voir supérieur à celui des facteurs abiotiques, dans le contrôle des fonctions des écosystèmes terrestres mais aussi au niveau de la structure des communautés microbiennes du sol (Verville, 1998). La présence de plantes augmente d'une manière significative l'humidité du sol, la biomasse et la respiration

microbienne (Singh, 2009). Ainsi, Köberl et al. (2011) ont montré que la végétalisation des sols extrêmes entraînait des modifications au sein des communautés, avec notamment l'extinction de bactéries extrémophiles. La diversité de espèces végétales a aussi un rôle important dans la modulation de la structure des communautés bactériennes (Shann et Boyle 1994; Marschner et al., 2001; Kowalchuk et al., 2002; Costa et al., 2006; Puglisi et al., 2013) et fongiques (Berg et Smalla 2009). La morphologie des racines est différente suivant l'espèce végétale observée, ce qui implique une rétention différente de l'humidité au niveau de la rhizosphère (Hertenberger et al., 2002; Hinsinger et al., 2005; McNear 2013). De plus, les modulations des communautés microbiennes se font au travers de la qualité des exsudats racinaires, qui induisent chez les microorganismes une compétition pour les ressources nutritives (Haichar et al., 2008; Broeckling et al., 2008, Mouhamadou et al., 2013). Les exsudats racinaires contiennent de nombreux composés, tels que des acides aminés, des acides carboxyliques, des polysaccharides de haut poids moléculaire, des composés phénoliques, des vitamines et des enzymes comme les peroxydases et tyrosinases (Singer et al., 2003; Muratova et al., 2009a,b). Ainsi, au niveau de la rhizosphère, ces exsudats permettent de nourrir un nombre de microorganismes bien plus important (2 à 25 fois plus) par rapport à un sol non rhizosphérique (Bazin et al., 1990). La végétalisation des sols par des plantes augmenteraient l'abondance des bactéries (Aprill et Sims, 1990; Reilley et al., 1996; Binet et al., 2001). En parallèle d'une augmentation du nombre de microorganismes, les activités microbiennes du sol sont de 2 à 100 fois plus élevées dans la rhizosphère par rapport à un sol non rhizosphérique (Bazin et al., 1990; Günther et al., 1996; Atlas et Bartha 1998).

En Allemagne, une étude comparative de sols forestiers et de sols de prairies, a été réalisée par Nacke et al. (2011). Ces auteurs ont mis en évidence une variabilité de la structure des communautés bactériennes, indirectement liée à la variabilité des espèces végétales présentes, qui induisent des pH différents dans le sol. Ainsi, une diversité plus importante a été observée dans les sols de prairies en comparaison des sols forestiers. Les taxons majoritairement représentés dans ces deux types de sols étaient les Proteobacteria, les Acidobacteria, les Actinobacteria et les Firmicutes avec une abondance relative de chacun des phyla qui variait selon l'usage du sol. Les taxons dominants dans les sols forestiers étaient Alphaproteobacteria (25%), Acidobacteria (20%), Actinobacteria (13%) et Betaproteobacteria (6%), alors que dans les sols de prairies, le groupe phylogénétique prédominant était l'Actinobactéries (20%) suivi d'Acidobacteria (19%), d'Alphaproteobacteria (11%) et de Betaproteobacteria (6%). De plus, une variabilité des communautés bactériennes a également

pu être observée entre individus d'une même espèce végétale. L'étude de plants de maïs présentant des génotypes variés par Peiffer et al. (2013) a montré une variabilité de la communauté bactérienne intra-espèce végétale. Les travaux de Becklin et al. (2012) ont également montré qu'une modulation de la composition des communautés fongiques au sein de la rhizosphère est également dépendante des espèces végétales implantées. Dans des sols forestiers, Buée et al. (2009) ont montré que, bien que les *Dikarya* (*Ascomycota* et *Basidiomycota*) étaient les taxons majoritaires, la variabilité spatiale de la diversité et les différences de richesses observées pouvaient être expliquées en partie par la présence de différentes espèces arboricoles, distribuées sur ces sols. La structuration des communautés fongiques serait principalement liée à la concentration en nitrate et en azote soluble, mais également à la morphologie des racines des espèces végétales (Mouhamadou et al., 2013).

Bien que les bactéries et les champignons vivent en étroite relation dans le sol, ces deux communautés ont souvent été étudiées indépendamment l'une de l'autre dans de nombreux habitats. Néanmoins, quelques études ont examiné simultanément les évolutions de ces deux communautés (Costa et al., 2006), sans toutefois tenter de comprendre les interactions entre elles. Les interactions champignons-bactéries sont très certainement de trois types, positive, négative ou neutre. Singh et al. (2009) ont observé une forte corrélation positive entre les communautés bactériennes et fongiques indépendamment des facteurs abiotiques du sol (humidité, teneurs en C et en N) à l'échelle du champ. Des travaux précédents avaient déjà montré qu'un CMA, *Glomus mosseae*, avait un impact direct sur la structure de la communauté bactérienne au niveau des racines de plantes (Artursson et al., 2005). Qin et al. (2016) ont constaté aussi que les bactéries appartenant à la classe de Burkholderiales ont été stimulées par la présence de CMA dans des sols contaminés par des PCB.

Cadre général
et
objectifs de la thèse

Cadre général et objectifs de la thèse

En 1998, des taux de dioxines supérieurs à 15 pg/L sont mesurés dans le lait des vaches pâturant à proximité de l'incinérateur d'Halluin, alors que le taux d'alerte est de 3 pg/L. Bien qu'aucune réglementation n'impose l'arrêt des activités d'élevage lorsque les sols sont contaminés par des PCDD/F, Lille Métropole Communauté Urbaine (LMCU), assistée d'experts agricoles, a décidé de fermer l'incinérateur en activité depuis 30 ans et d'arrêter l'élevage dans la zone la plus contaminée. En conciliant le maintien de l'activité agricole périurbaine et le respect de la santé des populations, les parcelles contaminées ont fait l'objet d'une maîtrise foncière communautaire, dans l'attente d'un projet d'aménagement et/ou de requalification.

Afin d'évaluer l'ampleur de la contamination des sols d'Halluin plus de dix années après la fermeture de l'incinérateur, des analyses de divers polluants (dioxines, furanes, biphényles chlorés (PCB), polychlorobiphényles "dioxine-like" (PCB-DL), éléments traces métalliques (ETM) contenus dans le sol ont été effectuées sur des échantillons prélevés en 2010 à trois profondeurs différentes (0-10 cm, 10-20 cm et 20-30 cm). Les résultats obtenus montrent des teneurs en ETM et PCB-DL faibles, similaires dans les trois horizons de sol et équivalentes aux teneurs moyennes régionales. En revanche, la comparaison des résultats (teneurs en équivalent toxique et profil de congénères) avec ceux obtenus en 1998 sur le même site (prélèvement effectué entre 0 et 10 cm de profondeur) montre que la teneur en dioxines et furanes restait élevée (1998 : 50,2 ng TEQ/Kg de sol et 2010 : 42,2 ng TEQ/Kg de sol) suggérant une dégradation limitée de ces polluants en l'espace de 12 ans et que la mise en place d'une méthode de dépollution de ces sols était nécessaire.

Dans ce cadre, l'association Halluin 3R (Recherche, Réseau, Requalification) a été créée pour trouver des solutions innovantes pour remédier à la pollution des sols par les dioxines. Un réseau de partenaires associatifs, publics et privés a été constitué autour de cette problématique dans le cadre d'un Programme Chercheurs-Citoyens et a conduit au développement du projet de recherche « Dioxines : contamination et biodégradation ». Ce projet, piloté par Halluin 3R, a été co-financé par le PO FEDER, l'ADEME, le LMCU et par la Région Hauts de France. Les objectifs généraux de ce projet étaient :

1. La caractérisation pédologique et la caractérisation de la contamination en PCDD/F du site atelier de la ferme du Noir Pot (cf. présentation dans la partie « matériels et méthodes »).

2. L'étude des potentialités de biodégradation des PCDD/F de deux groupes de champignons microscopiques du sol.

- a. les champignons saprotrophes.
- b. et les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA).

3. L'évaluation de la contamination en dioxines de légumes cultivés sur la zone atelier.

Mon travail de thèse s'inscrit dans le contexte général du projet « dioxines : contamination et biodégradation » et traite, en particulier, de l'étude des potentialités de biodégradation des dioxines/furanes par phytoremédiation assistée par les CMA, un des trois sous projets de la phase 2 du projet.

En effet, le projet « Dioxines : contamination et biodégradation » s'est déroulé en trois phases. Après une phase préliminaire de caractérisation de la parcelle expérimentale de la ferme de Noir Pot, la phase 1 du projet « Dioxines : contamination et biodégradation » a débuté en avril 2012 dans le cadre d'un stage de Master 1 (Q.YU, 2012) puis de mon stage de master 2 en 2013. Les travaux menés dans le cadre de ces deux stages ont permis de faire un état des lieux de la mycorhization de la parcelle d'Halluin, en isolant et en identifiant sur la base de critères morphologiques (en collaboration avec le Dr Y. Dalpé, Agriculture and Agri-Food Canada à Ottawa (Research and Development Centre)), des spores de différentes espèces de CMA (*Glomus geosporum*, *F. mosseae* et *Glomus constrictum*) à partir de ces sols pollués d'Halluin, mais aussi en quantifiant la biomasse microbienne du sol grâce à des marqueurs lipidiques spécifiques des CMA : le C16:1W5 (1,5µg/g), des champignons saprotrophes et ectomycorhiziens : le C18:2W6,9 (0,45µg/g) et des bactéries : i15:0, a15:0, i16:0, i17:0 et a17:0, cy17:0, C18:1W7 et cy19:0) (8,5µg/g). Il a été également montré que les spores d'un CMA modèle, *Rhizophagus irregularis*, ont la capacité de germer *in vitro* en présence de concentrations en PCDD/F 10 fois supérieures à celles des sols d'Halluin. Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence, en utilisant des cultures en microcosmes, la possibilité d'installation de l'inoculation mycorhizienne exogène en présence des PCDD/F avec un effet bénéfique sur la croissance notamment du trèfle et de la luzerne. Cependant, aucune dissipation des PCDD/F n'a pu être détectée, après 6 semaines de culture des plantes sur les sols contaminés d'Halluin. Par la suite, une nouvelle expérimentation a été menée en prolongeant le temps de culture jusqu'à 20 semaines, ce qui a permis de montrer l'intérêt de la végétalisation dans la dissipation des PCDD/F. Cependant, il nous a été difficile d'estimer l'apport de l'inoculation mycorhizienne dans cette dissipation des PCDD/F puisque la

présence de spores autochtones dans le sol d'Halluin a engendré la mycorhization spontanée de l'ensemble des plantes testées (inoculées ou non).

Dans le cadre de la présente thèse qui s'inscrit dans la phase 2 du projet « Dioxines : contamination et biodégradation », trois nouvelles expérimentations ont été conduites en microcosmes visant à étudier :

1. l'importance du choix de l'espèce végétale dans la phytoremédiation assistée par les CMA mais aussi son influence sur le microbiote du sol contaminé. C'est ainsi que différentes espèces végétales (trèfle, luzerne, ray-grass, fétuque, miscanthus et un mélange de plantes) ont été testées en présence et en absence d'inoculum mycorhizien commercial (*Glomus sp*) sur un sol historiquement contaminé par les PCDD/F stérilisé ou non. La structure, la composition et la diversité des communautés bactérienne, archéenne et fongique du sol et leur rôle dans la dissipation des PCDD/F après 20 semaines de culture ont été analysés (**publication 1**).
2. l'influence de l'origine d'inocula mycorhiziens (commercial et autochtone) sur la croissance des plantes, sur la structure de la communauté microbienne (bactéries, archées et champignons) des sols contaminés par les PCDD/F et sur la dissipation de ces polluants après 24 semaines de culture (**publication 2**).
3. l'optimisation des conditions de dissipation des PCDD/F en ajoutant des amendements organiques comme les rhamnolipides, biosurfactant ayant la propriété d'augmenter la biodisponibilité des PCDD/F et biologiques tels qu'une bactérie à capacité dégradante des PCDD/F (*S. wittichii* RW1) et un inoculum mycorhizien commercial (*F. mosseae*) (**publication 3**).

Partie – II – Matériels et Méthodes

Partie II.

Matériels et Méthodes

1. Présentation du site expérimental de la Ferme de Noir Pot à Halluin

La parcelle expérimentale de 3500 m² de la ferme du Noir Pot est située à 175 m à l'arrière du site de l'ancien incinérateur d'Halluin remplacé aujourd'hui par le centre de valorisation énergétique Antares (Figure 9).



Figure 9 : Vue aérienne du site de la ferme de Noir Pot (rectangle rouge).

Lors de la première phase d'étude du projet, cette parcelle expérimentale avait été échantillonnée en une seule fois selon un échantillonnage "non aligné" composé de 72 points géo-référencés (3 prélèvements élémentaires de terre par échantillon). Le sol ayant été labouré au moins une fois depuis l'arrêt de l'incinérateur tenu pour responsable de la contamination, il avait été décidé d'effectuer les prélèvements sur une profondeur de 30 cm. Chaque échantillon

a été ensuite caractérisé à la fois pour évaluer ses caractéristiques pédologiques (données non présentées), mais aussi pour en mesurer les teneurs en PCDD/F (Figure 10).

L'analyse statistique des teneurs en PCDD/F des échantillons de sol avait montré un niveau de contamination en PCDD/F modéré mais une hétérogénéité de la contamination à l'échelle de la parcelle (Figure 10). Des variations allant de 40 à 300 ng/kg ont été observées (Figure 11).

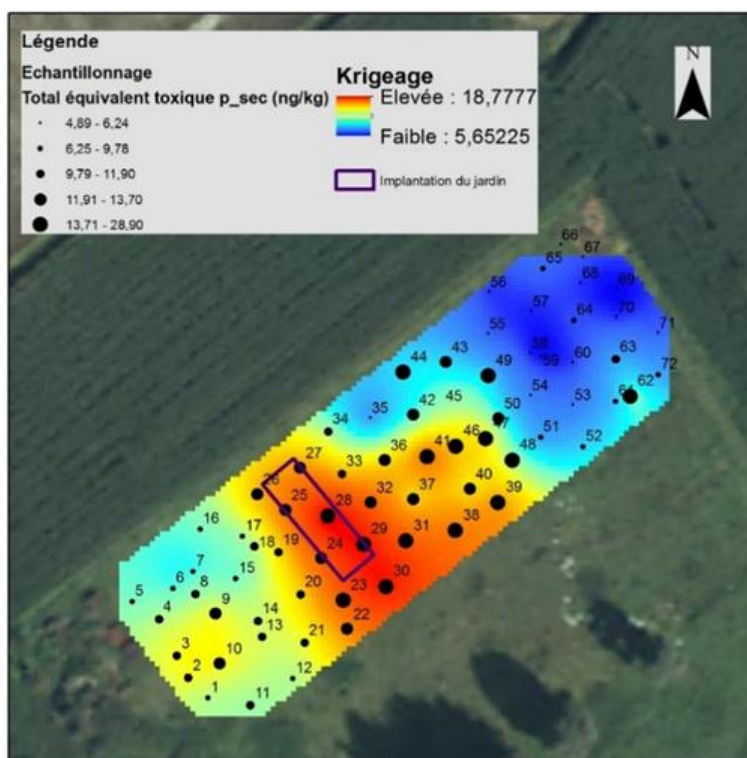


Figure 10 : Répartition spatiale des 72 échantillons selon la grille non alignée et présentation par cartogramme et interpolation spatiale des concentrations totales de PCDD/F en équivalent toxique (analyses statistiques réalisées par l'unité Infosol de l'INRA d'Orléans).

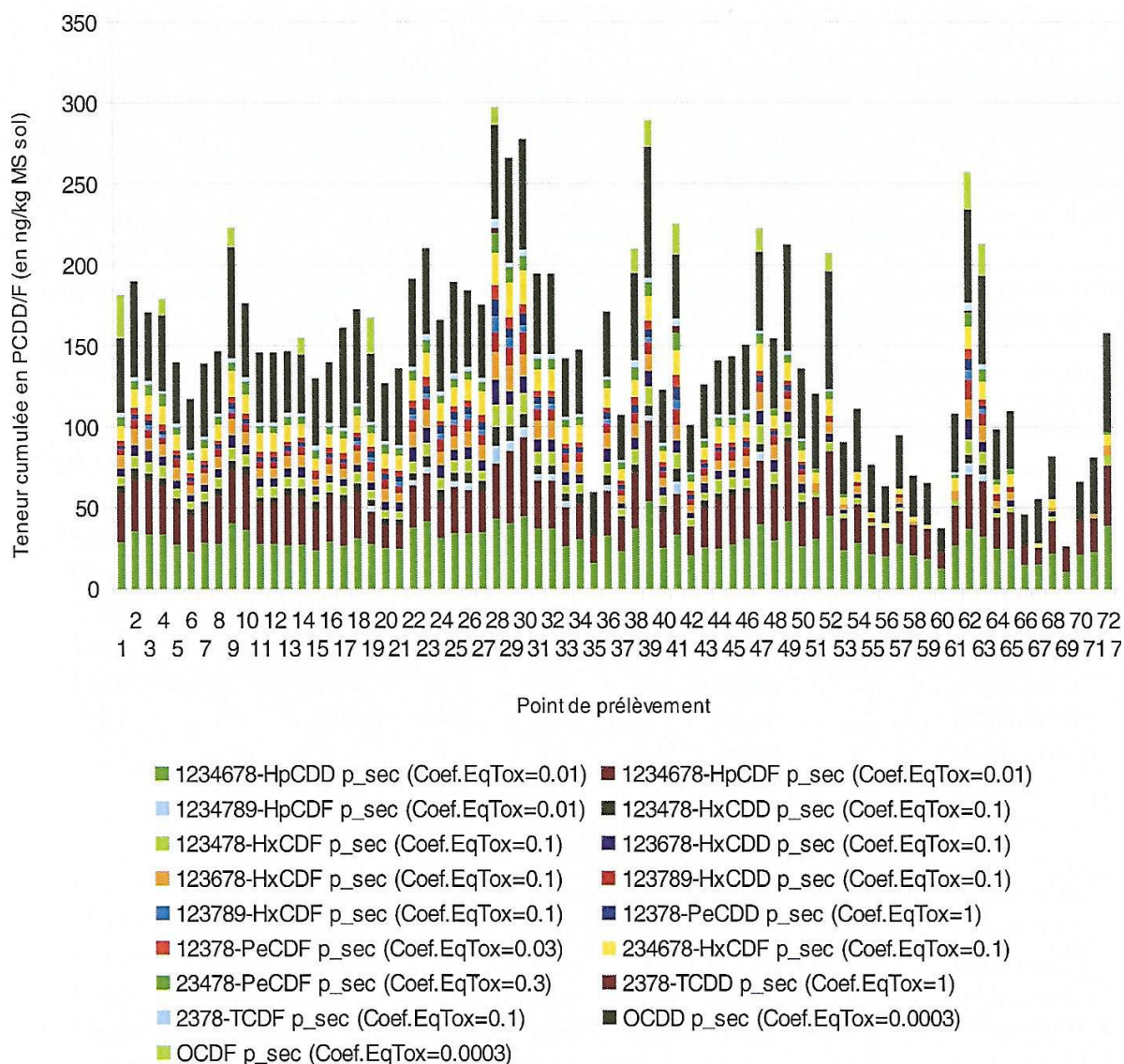


Figure 11 : Teneurs cumulées des différents congénères de PCDD/F dans chaque échantillon de sols.

2. Prélèvement du sol sur la parcelle expérimentale

Le sol historiquement contaminé par les PCDD/F utilisé dans les expérimentations de la présente thèse a été prélevé en décembre 2013 dans la zone la plus contaminée de la parcelle entre les points 29 et 30 (250 ng/kg, 18 ng.TEQ/kg) à une profondeur de 30 cm. Ce sol a été séché à température ambiante, tamisé à 2 mm et homogénéisé. Une partie a été stérilisée par ionisation aux rayons γ (45KGy) par la société IONISOS (Sablé sur Sarthe) afin d'éliminer les communautés microbiennes telluriques. Les paramètres pédo-agronomiques et le niveau de

contamination du sol, remesurés avant et après stérilisation, sont représentés dans le Tableau 5 et la Figure 12.

Tableau 5 : Caractéristiques pédo-agronomiques du sol d'Halluin avant et après stérilisation aux rayons gamma (45KGy).

Paramètres	Sol non stérilisé	Sol stérilisé
Argile (< 2 µm) (g/kg)	135	135
Limons fins (2/20 µm) (g/kg)	149	149
Limons grossiers (20/50 µm) (g/kg)	440	431
Sable fins (50/200 µm) (g/kg)	250	257
Sable grossiers (200/2000 µm) (g/kg)	26	28
Azote (N) total (g/kg)	1,57	1,53
Carbone (C) organique (g/kg)	26,4	25,1
C/N	16,9	16,3
pH	6,42	6,34
Calcaire (CaCO ₃) total (g/kg)	<1	<1
Phosphore (P ₂ O ₅) (g/kg)	0,028	0,027
Silicium (Si) (g/100g)	0,204	0,207
Aluminium (Al) (cmol ⁺ /kg)	0,0281	0,0469
Calcium (Ca) (cmol ⁺ /kg)	10,2	9,82
Fer (Fe) (cmol ⁺ /kg)	0,0052	0,0089
Magnésium (Mg) (cmol ⁺ /kg)	1,07	1,06
Manganèse (Mn) (cmol ⁺ /kg)	0,0631	0,135
Potassium (K) cohex (cmol ⁺ /kg)	0,22	0,206
Sodium (Na) (cmol ⁺ /kg)	0,065	0,065
Dioxines/furanes (ng/kg)	185 ± 17	208 ± 40
Dioxines/furanes (TEQ.ng/kg)	14 ± 1,2	15 ± 0,9

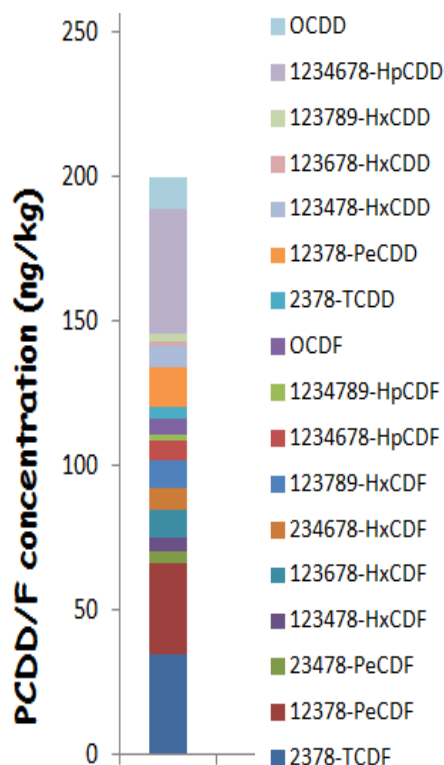


Figure 12 : Teneurs cumulées des différents congénères de PCDD/F dans le sol stérilisé avant phytoremédiation.

3. Les dispositifs expérimentaux en microcosmes

3.1. Expérimentation 1 : Importance du choix de l'espèce végétale dans la phytoremédiation des sols contaminés par les PCDD/F (publication 1, partie 3).

Afin d'évaluer l'importance du choix de l'espèce végétale dans l'efficacité de la phytoremédiation assistée par les CMA du sol provenant du site de la ferme de Noir Pot, différentes espèces végétales ont été cultivées sur un sol stérilisé par ionisation aux rayons γ et un sol non stérilisé. Cinq graines de luzerne (*Medicago sativa* L.), trèfle (*Trifolium pratense* L.), ray-grass (*Lolium perenne* L.), fétuque (*Festuca arundinacea* Schreb.), ont été semées par pot en condition végétalisée alors que le miscanthus (*Miscanthus×giganteus*) est cultivé à partir de rhizomes pré-germés prélevés sur une parcelle agricole à Linzeux (62). Des pots non végétalisés ont été utilisés comme des témoins. Ces plantes ont été cultivées dans des pots de 140 cm³ (10 cm de hauteur et 7,5 cm de diamètre) contenant 270 g de sol stérilisé ou non et 30 g d'inoculum mycorhizien Solrize® PRO autoclavé ou non (conditions non inoculée et inoculée). Le remplissage des pots s'est fait tout d'abord, par l'homogénéisation de 15 g de l'inoculum avec 135 g de sol avec une spatule, cette étape est refaite deux fois. En plus des

cinq espèces citées ci-dessus, un mélange de plantes « Rusti'Flore » (*Lavatera trimestris* L., *Gypsophila elegans* Bieb., *Centaurea cyanus* L., *Linum grandiflorum* Desf., *Calendula officinalis* L., *Agrostemma githago* L., *Cosmos bipinnatus* Cav., *Papaver rhoeas* L. et 8 espèces confidentielles, NOVA-FLORE, Champigné, France) a été cultivé dans des barquettes contenant 1800 g de sol pollué stérilisé et 200 g d'inoculum mycorhizien. Les pots et les barquettes contenant un sol stérilisé ont été arrosés après le jour de lancement de culture avec 10 et 65 ml d'un filtrat contenant la microflore microbienne du sol respectivement. Ce filtrat a été obtenu après imbibition d'un sol non stérilisé avec de l'eau déminéralisée (2 kg/l), récupération et filtration (< 40 µm) de la solution du sol. L'expérimentation a été conduite en 5 réplicats pendant 20 semaines de culture à une température d'environ 20°C et une photopériode 12/12 (h). Les plantes ont été déplacées dans la salle de culture une fois par semaine afin de limiter les variations de croissance dues à des conditions d'éclairage différentes.

3.2. Expérimentation 2 : Influence de l'origine de l'inoculum mycorhizien sur la phytoremédiation des sols pollués par les PCDD/F (publication 2, partie 3).

Afin d'étudier l'influence de l'origine des inocula mycorrhiziens sur l'efficacité de la phytoremédiation des sols contaminés par les PCDD/F, deux inocula ont été testés. Le premier inoculum est un mélange (50/50, p/p) de deux inocula commerciaux FR140® (*Funneliformis mosseae*, MycAgro Ltd., France) et Solrize® (*Glomus sp.* Agrauxine Ltd., France), chaque inoculum est composé d'un mélange de propagules (10 propagules/g) et d'un substrat solide granuleux inerte. Tandis que le second est un inoculum autochtone, obtenu par piégeage au laboratoire, en cultivant pendant 6 mois, du poireau (*Allium porrum*) sur le sol historiquement contaminés par les PCDD/F de la ferme de Noir Pot. Cet inoculum constitué de racines colonisées, de spores et de mycélium contient 4 espèces de CMA identifiées sur la base des critères morphologiques par le Dr Yolande Dalpé (CRECO, Ottawa) : *Glomus constrictum*, *Glomus lamellosum*, *Glomus geosporum* et *F. mosseae*.

Sur le sol végétalisé, dix graines de luzerne (*M. sativa* L.) ou de fétuque (*F. arundinacea* Schreb.) ont été semées dans des pots de 140 cm³ (10 cm de hauteur et 7,5 cm de diamètre) contenant 270 g de sol pollué préalablement stérilisé par ionisation aux rayons γ à 45 kGy et 30 g d'inoculum (commercial ou autochtone) autoclavé (non inoculé) ou non autoclavé (inoculé) en procédant comme précédemment décrit. L'expérimentation a été conduite en 5 réplicats pendant 24 semaines de culture à une température d'environ 20°C et une

photopériode 12/12 (h). L'ensemble des pots a été arrosé avec 10 ml d'un filtrat contenant la microflore microbienne du sol obtenu selon la méthode décrite précédemment. Les plantes ont été déplacées dans la salle de culture une fois par semaine afin de limiter les variations de croissance dues à des conditions d'éclairement différentes.

3.3. Expérimentation 3 : optimisation des conditions de phytoremédiation des sols pollués par les PCDD/F (publication 3, partie 3).

Afin d'essayer d'améliorer les taux de dissipation des PCDD/F grâce à la phytoremédiation assistée par les CMA, les différentes stratégies, citées ci-dessous, ont été mises en place :

- Introduction de la solution de rhamnolipides (rh) (AGAE Technologies, USA) par arrosage des sols deux jours après le lancement des cultures, de telle façon à obtenir une concentration finale de 100 mg/kg de sol.
- Introduction de la bactérie *S. wittichii* RW1 qui nous a été aimablement envoyée par M^{me} Hartmann Erica du laboratoire CEA de Marcoule. Préalablement isolée sur boîte de Pétri, cette bactérie a été cultivée dans un milieu liquide LB pendant 48h à 37°C. Après centrifugation, le culot bactérien a été repris dans une solution de Bushnell-Haas. 5 ml de la suspension bactérienne à $3,2 \cdot 10^8$ UCF/ml est répartie à la surface de chaque pot quatre jours après le lancement de la culture.
- Une extraction des PCDD/F a été effectuée à partir de 25 kg de sol broyé et tamisé à 2 mm. Cette extraction a été réalisée sous micro-ondes (Multiwave 3000, Anton Paar) pendant 25 min dans un mélange toluène/éthanol (10/1) à 50°C et à 20 bars. Les PCDD/F ont été repris dans de l'acétone et introduits dans le sol historiquement contaminée d'Halluin. Uniquement 1/10 de poids final de sol est dopé en ajoutant la solution des PCDD/F à hauteur de 1/0,6 (p/v). Le sol dopé est ensuite laissé une nuit sous une sorbonne afin d'éliminer l'acétone, puis mélangé au sol non dopé afin de préserver la microflore tellurique (Brinch et al., 2002). Ce dopage nous a permis d'augmenter la concentration en PCDD/F du sol d'environ 25% atteignant ainsi une concentration de 266 ng/kg dans le sol qui correspond à 26,15ng. TEQ/kg

Dans le cadre de cette expérimentation, l'ajout de l'inoculum commercial (*F. mosseae*, 10 propagules/g, MycAgro Ltd., France) et l'introduction de la bactérie *S. wittichii* RW1, des rhamnolipides et de la microflore indigène ont été testés selon les modalités suivantes :

	Témoin	Luzerne (L)	<i>F. mosseae</i> (Fm)	<i>S. wittichii</i> (RW1)	Rhamnolipides (Rh)	Microflore indigène (µf)
Non végétalisé	+					
L		+				
L+Fm		+	+			
L+Fm+RW1		+	+	+		
L+Fm+RW1+Rh		+	+	+	+	
L+Fm+RW1+Rh+µf		+	+	+	+	+

Dix graines de luzerne ont été semées par pot (150 cm³) contenant 270 g de sol stérilisé et dopé par ajout d'une quantité de PCDD/F extraite du sol de la ferme de Noir Pot. 30 g d'inoculum mycorhizien commercial *F. mosseae* autoclavé ou non (conditions non inoculée et inoculée) ont été ajoutés par pot. L'expérimentation a été conduite en 3 réplicats pendant 24 semaines de culture à une température d'environ 20°C et une photopériode 12/12 (h). L'ensemble des pots a été arrosé le jour de lancement de l'expérience avec 10 ml d'un filtrat contenant la microflore microbienne du sol obtenu selon la méthode décrite précédemment. Les plantes ont été déplacées dans la salle de culture une fois par semaine afin de limiter les variations de croissance dues à des conditions d'éclairage différentes.

4. Mesure des développements fongiques et végétaux

4.1. Détermination de la biomasse sèche aérienne et racinaire

Après 20 ou 24 semaines de culture, les plantes sont prélevées. Le système racinaire de chaque plante est lavé à l'eau distillée, ensuite les parties aérienne et racinaire sont lyophilisées pendant 48 h, puis la matière sèche des différents organes est estimée.

4.2. Détermination du taux de mycorhization

Les racines sont préalablement éclaircies avec une solution de KOH 10 % pendant 20 min à 90°C. Ces racines sont ensuite abondamment rincées à l'eau distillée puis colorées avec une solution de bleu de Trypan 0,05 % pendant 15 min à 90°C. Enfin, les racines sont rincées à l'eau distillée et conservées à 4°C. 75 fragments racinaires de 1cm sont placés entre lames et lamelles, à raison de 15 fragments par lame et 3 lames par pot pour une observation sous microscope aux grossissements (x 40). La présence des structures fongiques spécifiques des CMA observées à l'intersection entre l'axe de l'objectif et le fragment racinaire est relevée (McGonigle et al., 1990). Trois lectures par fragment sont réalisées. Le pourcentage de colonisation total est égal au nombre d'intersections avec les racines mycorhizées $\times 100 /$ nombre d'intersections totales.

5. Extraction et quantification des PCDD/F dans le sol et dans le matériel végétal

5.1. Extraction et quantification des PCDD/F dans le sol

Le dosage des PCDD/F contenus dans les sols a été effectué par le laboratoire d'analyse des sols de l'INRA d'Arras. Les PCDD/F sont extraits à partir de 10g de sol broyé et tamisé à 2 mm au toluène par Accelerated Solvent Extraction (ASE) à chaud (50°C) et sous pression (103 bar) pendant 5 min. Après purification sur colonnes de silice multicouche et charbon actif, l'extrait est concentré à 200 μ L. Les teneurs en PCDD/F sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse munie d'un détecteur à spectrométrie de masse à haute résolution (GC/HRMS). Chaque PCDD/F est identifié par deux ions moléculaires caractéristiques et leur temps de rétention. Les résultats donnent les concentrations des composés analysés exprimées en ng/kg et en ng TEQ/kg (OMS, 2005). Le calcul en équivalent toxique (TEQ) d'un mélange donné, consiste à multiplier la concentration de chaque congénère par son facteur d'équivalent toxique (TEF), puis à sommer l'ensemble des contributions : Concentration en TEQ = $\sum_{1-17} (TEF \times \text{concentration massique du PCDD/F})$, voir un exemple de calcul dans le tableau 6). Sur cet exemple, l'OCDD est un congénère qui est présente en concentration élevée mais qui présente une faible toxicité. Cette observation est liée au très faible facteur d'équivalence toxique de l'OCDD (0,0003). En revanche la TCDD (TEF=1) présente une toxicité élevée alors que sa concentration est faible par rapport aux autres congénères.

Tableau 6 : Exemple de calcul de la concentration d'un échantillon en TEQ

Congénère	Concentration en ng/kg	TEF (OMS 2005)	Concentration en TEQ
2378-TCDF	2,30	0,1	0,230
12378-PeCDF	4,10	0,03	0,123
23478-PeCDF	5,86	0,3	1,758
123478-HxCDF	7,78	0,1	0,778
123678-HxCDF	6,93	0,1	0,693
234678-HxCDF	11,02	0,1	1,102
123789-HxCDF	5,96	0,1	0,596
1234678-HpCDF	29,77	0,01	0,298
1234789-HpCDF	5,7	0,01	0,057
OCDF	35,03	0,0003	0,011
2378-TCDD	1,71	1	1,71
12378-PeCDD	5,54	1	5,54
123478-HxCDD	6,84	0,1	0,684
123678-HxCDD	6,85	0,1	0,685
123789-HxCDD	4,95	0,1	0,495
1234678-HpCDD	28,2	0,01	0,282
OCDD	40,27	0,0003	0,012
Total	208,81	-	15,054

5.2. Extraction et quantification des PCDD/F dans le matériel végétal

Les PCDD/F des parties racinaire ou aérienne de la luzerne sont extraits à partir de 20 g de biomasse végétale. L'extraction est réalisée à chaud (50°C) et sous pression (103 bars) dans du toluène à l'aide d'un système ASE sous différentes conditions :

- Un blanc d'extraction a été réalisé avec de la célite et du sable de Fontainebleau,
- 10 g de la partie racinaire ou aérienne de la luzerne non dopé ont été mélangés à 4 g de célite et du sable de fontainebleau,

- 10 g partie racinaire ou aérienne de la luzerne dopé avec l'ajout de 20µl d'une solution contenant les PCDD/F natives ont été mélangés avec 4 g de célite et du sable de Fontainebleau.

Les extraits sont concentrés à 40°C sous un léger flux d'azote. Le résidu sec est repris dans un volume de 2 ml d'hexane pur. Après purification sur colonnes de silice multicouche et charbon actif, l'extrait est concentré dans 200µL d'hexane. Les teneurs en PCDD/F sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse munie d'un détecteur à spectrométrie de masse à haute résolution (GC/HRMS). Chaque PCDD/F est identifié par deux ions moléculaires caractéristiques et leur temps de rétention. Les estimations des teneurs en « Dioxines » des échantillons non dopé et dopé permettent de déterminer le rendement d'extraction des « Dioxines ».

Le rendement en « Dioxines » est calculé à partir de la formule suivante :

$$\frac{[\text{échantillon dopé mesuré}] - [\text{échantillon non dopé mesuré}]}{[\text{Teneur théorique en « Dioxines » de l'échantillon dopé}]} * 100 = \text{Rendement \%}$$

6. Dosage du contenu pigmentaire dans les parties aériennes

Le dosage des pigments photosynthétiques a été effectué à partir de 25 mg de feuilles congelées à -80°C, broyées dans un mortier en présence de 25 mg de carbonate de magnésium, 5ml d'acétone 80% et une pincée de sable de Fontainebleau. Le tout est transféré dans un tube en verre avec un bouchon et placé pendant une nuit à 4°C à l'obscurité sous agitation permanente. 3ml de la solution a été centrifugée à 4°C, 10 000g et pendant 10 min. Les caroténoïdes et les chlorophylles a et b ont été mesurées à partir du surnageant à des longueurs d'ondes spécifiques 470, 663 et 647 nm respectivement. Les concentrations des pigments sont déterminées grâce aux équations de Lichtenthaler (1987). [Chla] µg/ml = 12,25 x A₆₆₃ - 2,79 x A₆₄₇ = Ca; [Chlb] µg/ml = 21,50 x A₆₄₇ - 5,10 x A₆₆₃ = Cb; [Car] µg/ml = (1000 x A₄₇₀ - 1,82 x Ca - 85,02 x Cb)/198

7. Mesure de l'activité microbienne du sol

7. 1. Dosage de la fluorescéine di-acétate hydrolase (FDA Hydrolase).

1 g de sol humide frais est placé en présence de 7,5 ml de tampon phosphate 60 mM, 100µl de substrat fluorescéine di-acétate (Sigma-Aldrich) à 1 M. Après incubation à 30°C sous

agitation (50 rpm) pendant 1h, la réaction est arrêtée en ajoutant à 1 ml de surnageant, 1 ml d'acétone. Après centrifugation (10000 rpm), 200µl de surnageant sont déposés dans une microplaque de 96 puits à Fond noir (Fisher Bioblock). La fluorescence du produit (fluorescéine) est lue à l'aide d'un spectrofluorimètre (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific) (λ émission = 523 nm ; λ excitation = 494 nm). La gamme étalon est réalisée à l'aide d'une solution de fluorescéine à 100µg/ml (Sigma-Aldrich).

7. 2. Dosage de la déshydrogénase

L'activité déshydrogénase (DHA) est mesurée par spectrométrie selon le protocole modifié de Tabatabai (1982). 6 g de sol frais ont été mélangés avec 1% du carbonate de calcium (CaCO₃), 1ml de la solution de chlorure de triphényl tétrazolium (TTC) à 3% et 2,5 ml d'eau ultra pure. Après une incubation de 24h à 37°C et à l'obscurité, le triphenylformazan (TPF) est extrait 3 fois dans 10 ml de méthanol sous agitation horizontale à 200 rpm pendant 1 h. La solution est ensuite centrifugée à 2000 rpm pendant 5 min et la concentration de TPF dans le surnageant est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre (Cary 100, Agilent Technologies) à 485 nm. Une gamme d'étalon est réalisée à l'aide d'une solution de TPF à 60µg/ml (Sigma-Aldrich).

8. Caractérisation des communautés microbiennes du sol

8.1. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction d'ADN génomique total a été extraite à partir de 250 mg de sol humide stocké à -80°C en utilisant le kit Nucleospin Soil[®] (Macherey-Nagel, Allemagne, selon le protocole fourni par le fabricant). Le principe de ce protocole est basé sur 3 étapes principales : 1) Extraction de l'ADNg du sol avec un tampon de lyse SL2 et l'enhancer SX améliorant le rendement d'extraction de l'ADN à l'aide d'un broyeur à billes. 2) Purification par précipitation des protéines avec un tampon de lyse SL3 sous centrifugation. 3) Le surnageant est nettoyé en le passant par une colonne d'élimination des inhibiteurs de NucleoSpin[®] préparé préalablement avec l'addition du tampon SB qui favorise la liaison d'ADN. Les substances humiques et d'autres inhibiteurs de PCR sont éliminés par un lavage avec le tampon de liaison SB et les tampons de lavage SW1/SW2. Après une étape de séchage, l'ADN est élué avec tampon d'éluion SE (5 mM Tris / HCl, pH 8,5). La qualité des ADNg extraits du sol a été vérifiée par dépôt sur gel d'agarose (1%) colorés au Gel Red (Molecular Probes Eugene, USA) et analysée à l'aide du Gel Doc (BioRad, USA). Les

échantillons d'ADNg ont été quantifiés en utilisant le kit Quant-IT™ dsDNA High-Sensitivity Assay (Invitrogen, USA). Ainsi 2µl d'échantillons de concentration en ADN inconnu ont été ajoutés au réactif de dosage dans les puits d'une microplaque de 96 puits. En parallèle, une gamme étalon allant de 0 à 50 ng d'ADN/mL est ajoutée à la plaque et la fluorescence de l'ensemble de la plaque est mesurée à l'aide du StepOne™ Real-Time PCR system (excitation 485, émission 517 nm). Une courbe des standards ADN est tracée sous SigmaPlot (Systat Software Inc., Californie, USA) et la concentration précise en ADNg des échantillons est calculée pour chacun des échantillons.

8.2 Séquençage à haut débit : étude de la biodiversité

8.2.1. PCR

Les régions d'ADNr 16S bactérien et archaebactériens et ITS1 fongique ont été amplifiées par PCR à partir de l'ADNg selon les conditions décrites dans le tableau 7, afin d'étudier la diversité bactérienne, archéenne et fongique.

Pour chaque échantillon les amplifications ont été réalisées avec un couple d'amorces présentant à son extrémité une séquence de 10 nucléotides spécifique pour chaque échantillon, appelé « Barcode », permettant d'identifier chacun des échantillons. Le mélange final réactionnel est de 25µl et contient 0.2mM de dNTP, 0.6µM de chaque amorce, 1,25µL de DMSO, 1 ng d'ADNg et 0.5U de Taq DNA polymerase (Roche, USA). L'ensemble des étapes d'amplification des amplicons archaebactériens, bactériens et fongiques ont été réalisés par nos collègues du Centre d'Innovation de l'Université de McGill de Montréal au Canada.

Tableau 7 : Caractéristiques du programme et des amorces utilisées dans le cadre des PCR pour le séquençage.

Communauté	Gènes	Amorces	Séquences 5'-3'	Programmes
Bactérie	ARN 16S	341F	CCT ACG GGN GGC WGC AG	94°C, 2 min (1 cycle)
	Région V3-V4	805R	GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC	
Archée	ARN 16S	517F	GCY TAA AGS RNC CGT AGC	94°C, 34s, 55°C, 30 sec; 72°C, 30 sec, 72°C, 10 min (30 cycles)
	Région V4-V5	909R	TTT CAG YCT TGC GRC CGT	
Champignon	ITS1	ITS1F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	
		58A2R	CTG CGT TCT TCA TCG AT	

8.2.2. Illumina sequencing

Le séquençage des produits d'amplification PCR (16S ARN bactérien et archaeobactérien, ITS1 fongique) pour l'analyse des communautés microbiennes des expérimentations en microcosmes a été réalisé par Illumina MiSeq par la plateforme de séquençage de nos collègues du Centre d'Innovation de l'Université de McGill de Montréal au Canada. La technologie développée par Illumina consiste en une amplification en ponts des fragments d'ADN fixé sur un support solide (flowcell) via un adaptateur liés aux ADN simple bris (ADNs). Les ADNs, une fois ancrés, sont amplifiés par l'ajout d'enzyme et de dNTP permettant la synthèse d'ADN double brin. Ces ADNs double brin nouvellement formé vont être séparés par dénaturation, puis une seconde étape d'amplification permet la création de plusieurs fragments d'ADN identiques dans chaque canal du support (formation de cluster - groupe) (Figure 14). La première étape du séquençage démarre en ajoutant 4 terminateurs réversibles marqués par des fluorochromes (caractéristiques des 4 différents dNTP), d'amorces et d'ADN polymérase. Après excitation par un laser, la fluorescence émise par chaque groupe est capturée permettant l'identification de la première base accrochée. On enlève ensuite aux ultra-violets le terminateur de la dernière base ajoutée, du nitrophényl, qui bloque la liaison OH qui permet l'enchaînement des bases (Figure 13). On peut alors procéder à l'ajout de la base suivante ; ainsi un cycle suivant démarre en renouvelant les 4 terminateurs réversibles marqués. Ainsi, pour les bases suivantes, l'opération est renouvelée autant de fois que nécessaire. Pour l'analyse des communautés microbiennes de nos différents échantillons, la première PCR à cibler les séquences d'intérêts pour l'identification (ARN 16S ou ITS1) et une seconde PCR vient ajouter les adaptateurs et les étiquettes nécessaires à rappeler l'information permettant de réattribuer chaque séquence à son échantillon original.

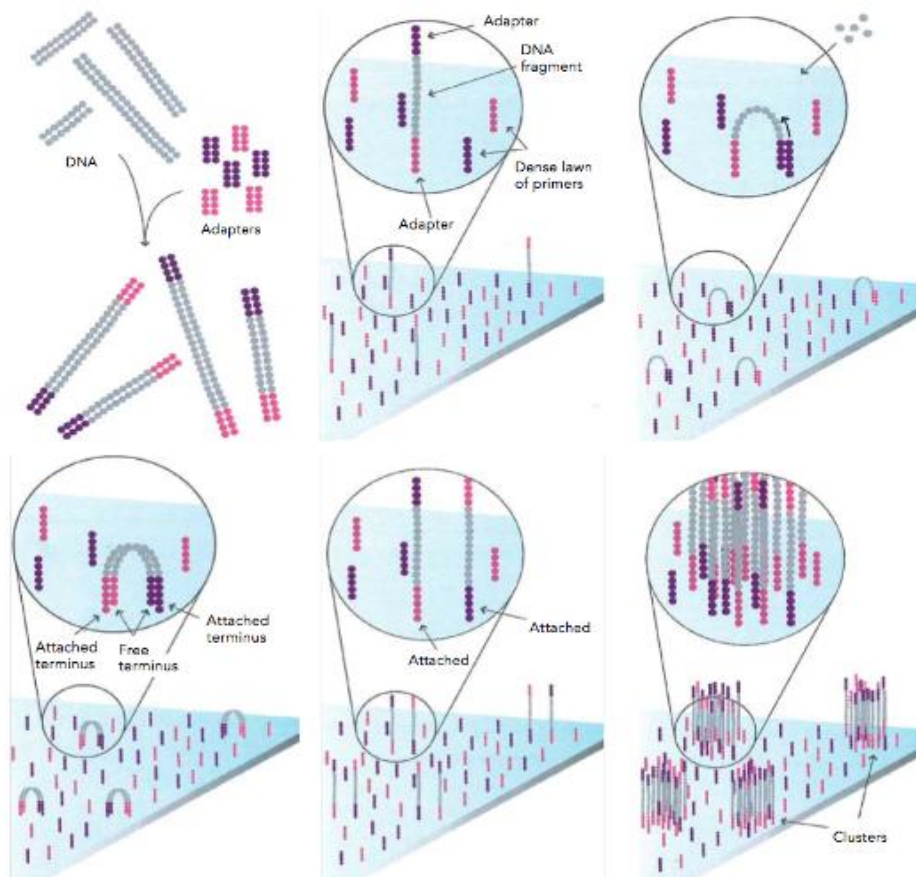


Figure 13 : Principe de la technologie Illumina (<http://www.illumina.com>)

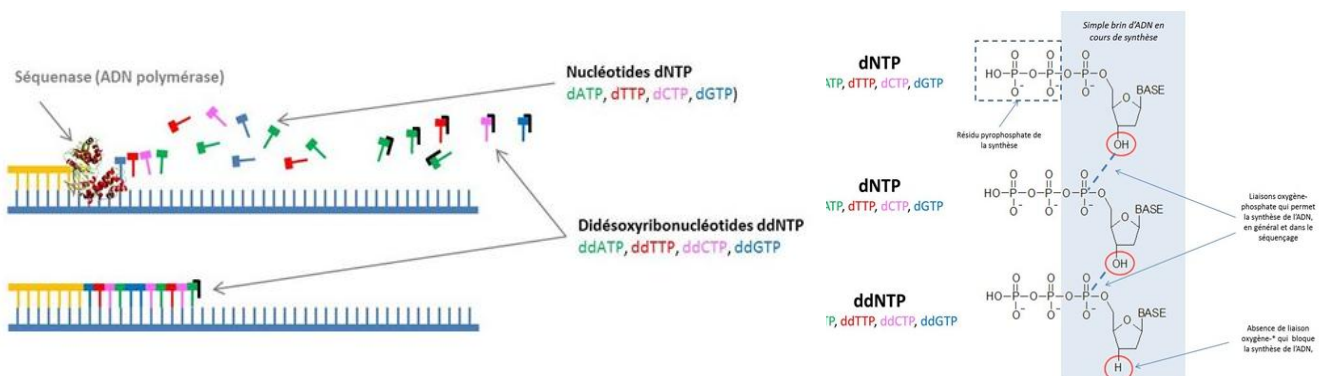


Figure 14 : Schémas d'ajout d'un terminateur réversible (<http://oezratty.net/wordpress/2012/technologies-sequançage-gnome-humain-3/>)

8.3 Analyses bioinformatiques

L'étude des données brutes issues du séquençage en Illumina ont été travaillées suivant une méthodologie décrite dans le projet « Brazilian Microbiome Project » (2014) (<http://www.brmicrobiome.org/16S-profiling-pipeline-illumina>) and (<http://www.brmicrobiome.org/ITS-profiling-pipeline-illumina>) avec quelques modifications. Les analyses des communautés microbiennes ont été réalisées en s'appuyant sur les programmes Mothur (version 13.34.4) selon la démarche décrite par Schloss et al. (2009) et QIIME (version 1.9.1) (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) selon Caporaso et al., (2010). L'exploitation des données brutes issues du séquençage Illumina a débuté par l'utilisation du programme Mothur réparties en diverses étapes : (i) groupement des séquences sens et antisens *via* la commande *make.contigs*, (ii) élimination des amorces (*trim.seqs*), (iii) élimination des singletons (*trim.seqs*), et séparation des fichiers fusionnées pour application dans QIIME. La détection des séquences chimériques a été effectuée dans cette étape avec Uchiime (<http://www.drive5.com/uchime.golf.fa>). Le programme Usearch a été utilisé afin de regrouper les séquences présentant une similarité supérieure ou égale à 97% en OTUs. Puis une séquence consensus de chaque OTUs a été affiliée taxonomiquement en utilisant les bases de données Green_13_8_16SrRNA pour les bactéries et les archaebactéries et la base HMM ITS rRNA gene database pour les champignons. Le nombre de séquences par échantillon étant hétérogène, une étape de sous échantillonnage au nombre minimal de séquences a été réalisé afin de pouvoir comparer les différentes conditions étudiées.

Analyse de l'alpha diversité.

Des analyses d'estimation de la richesse (Chao1 et nombre d'OTUs) et de diversité (Shannon) ont été estimés et calculé par QIIME. L'indice Chao1 correspond au nombre d'espèces différentes dans une communauté (Chao 1984). L'indice de Shannon prend en compte le nombre d'espèces et l'abondance des individus dans chaque espèce ; il varie entre 0 (signifiant une communauté dominée par une seule espèce) et $\ln S$ (avec S = le nombre d'espèce) où toutes les espèces présentes ont une abondance similaire (Shannon et Weaver, 1963).

9. Evaluation de la cytotoxicité des sols

L'évaluation de la cytotoxicité globale du sol avant et après phytoremédiation, a consisté à exposer deux lignées cellulaires (des cellules pulmonaires BEAS-2B et des cellules hépatiques HepG2) à différents extraits organiques de 160g de sol pollué par les PCDD/F, en

utilisant le toluène comme solvant d'extraction. Le choix des deux lignées cellulaires est basé sur deux critères à savoir, les propriétés physicochimiques des PCDD/F (volatilité et liposolubilité) et le mode d'administration par inhalation ou ingestion. Pour ce faire, un volume de 200 ml d'extrait de PCDD/F a été utilisé, cet extrait en réalisant une exposition de 48h afin d'évaluer leur éventuelle toxicité par l'intermédiaire de deux activités enzymatiques complémentaires. La première (lactate déshydrogénase LDH) permet de mettre en évidence l'augmentation de la perméabilité membranaire via le dosage de l'enzyme cytosolique qui pourrait être libérée dans le milieu de culture cellulaire après altération de la membrane (Cytotoxicity Detection Kit LDH, Roche Diagnostics), et la seconde (déshydrogénase mitochondriale MDH) permet de mesurer l'activité métabolique mitochondriale (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics). Les tests de cytotoxicité ont été réalisés dans des microplaques de culture à 96 puits (Corning® Cell BIND®, ThermoFisher Scientific ; Illkirch, France) et les cellules ont étéensemencées de manière homogène (100 µL/puit) de façon à obtenir 2x10⁴ cellules/puit en fin d'exposition. En plus des différentes conditions testées, 8 réplicats correspondant au témoin (cellules non exposées) dans lesquels seul le milieu de culture approprié aux lignées cellulaires est ajouté, ainsi que 8 puits correspondant au témoin positif (100% de mort cellulaire) auxquels du Triton X-100 (2% v/v) est ajouté le jour du test, ont été réalisés.

9. Analyses statistiques

Pour chaque résultats obtenus les tests de Shapiro-Wilk et de Bartlett sont utilisés pour vérifier la normalité et l'homoscédasticité des données ainsi que pour définir l'utilisation de test ANOVA (test paramétrique) ou Mann-Whitney et Kruskal-Wallis (test non paramétrique) (risque d'erreur 5%) grâce au logiciel XLSTAT 19.01 (Addinsoft, France). Les tests statistiques ont été menés sur 3 ou 5 réplicats. Pour normaliser les données initialement exprimées en pourcentage, celles-ci ont été transformées en coordonnées angulaires (arcsinus de la racine carrée). Les écarts types ont été calculés par Microsoft Office Excel 2007 pour toutes les données. Afin de relier les changements dans la composition de la communauté microbienne aux différentes variables (teneurs en PCDD/F, FDA, DHA, stérilisation, végétalisation), l'analyse de redondance (RDA) a été utilisée avec le logiciel CANOCO 4.5 (Biometris, Wageningen, Pays-Bas) réalisé par M. Stéphane Daigle de l'IRBV, Montréal, Canada.

Partie – III – Résultats

Partie III.

Résultats & Discussion

Présentation de la publication 1

Avant le lancement de tout projet de remédiation d'un sol contaminé, une caractérisation précise du site est indispensable pour déterminer la méthode de dépollution la plus appropriée aux conditions physico-chimiques et biologiques du sol. Ainsi une connaissance des paramètres simples tels que les caractéristiques de la contamination (nature, étendue, homogénéité de répartition et concentration), les paramètres pédo-agronomiques du sol ou, par exemple, les conditions climatiques du site peut permettre d'identifier les paramètres susceptibles de favoriser ou de limiter la faisabilité et les performances de la méthode de remédiation choisie.

L'un des paramètres clés qui peut influencer le succès, ou non, de la phytoremédiation est incontestablement la sélection de l'espèce végétale à mettre en place. Ce choix est essentiel et doit être effectué en fonction de plusieurs critères dont :

- l'usage futur du site,
- la filière de valorisation envisagée pour la biomasse produite,
- le cycle de développement et la vitesse de croissance (biomasse, densité racinaire, surface de feuillage...),
- la tolérance de l'espèce végétale aux contaminants,
- la capacité d'absorption, de dégradation et/ou d'accumulation de la plante,
- la profondeur des racines par rapport à la profondeur des sources de pollution,

De nombreux travaux ont montré que l'architecture racinaire, la concentration et la composition des exsudats racinaires, variables suivant l'espèce végétale considérée, vont moduler la composition, la structure, la richesse et l'abondance des communautés microbiennes colonisant les racines et le sol rhizosphérique (Marschner et al., 2001; Berg et Smalla 2009 ; Aleklett et al., 2015). Parmi ces microorganismes figurent les bactéries et les champignons saprotrophes à capacité dégradante qui sont à l'origine de la biodégradation des polluants organiques, et également les CMA permettant une meilleure protection de la plante contre la toxicité des polluants (Debiane et al., 2008, 2009, 2011) mais aussi une meilleure dissipation des polluants organiques tels que les PCB (Teng et al., 2010 ; Qin et al., 2016).

Ainsi, le premier objectif de cette thèse était de tester différentes espèces végétales (trèfle, ray-grass, luzerne, blé, miscanthus, fétuque et un mélange commercial de 16 plantes) décrites pour leur tolérance aux polluants organiques et pour leur capacité à participer à la dissipation de ces polluants,

sur le sol agricole historiquement contaminé par les PCDD/F de la Ferme de Noir Pot (Halluin) en présence et en absence d'un inoculum mycorhizien commercial (Solrhize ®). Il s'agissait de déterminer l'influence de ces espèces végétales sur la structure, la composition et la diversité des communautés bactérienne, archéenne et fongique du sol contaminé par les PCDD/F et sa conséquence sur la dissipation des PCDD/F. Afin d'éviter la mycorhization spontanée des plantes et pouvoir ainsi évaluer l'apport de l'inoculation mycorhizienne exogène dans la dissipation des PCDD/F, deux expérimentations en microcosmes ont été conduites en parallèle, l'une sur un sol stérilisé aux rayons γ et l'autre sur un sol non stérilisé.

Au cours de cette étude, nous avons montré que les cinq espèces végétales testées ainsi que le mélange commercial de plusieurs plantes arrivent à se développer sur les sols historiquement contaminés par les PCDD/F après 20 semaines de culture en microcosmes. Les taux de mycorhization obtenus étaient satisfaisants chez toutes les espèces végétales testées suite à l'ajout d'inoculum exogène commercial (sol stérilisé) ou à la présence de spores autochtones dans le sol non stérilisé (mycorhization spontanée). Le nombre d'OTUs, la richesse et la diversité des communautés bactériennes, archéennes et fongiques sont plus élevés dans le sol non stérilisé par rapport au sol stérilisé. Les espèces végétales et l'inoculation mycorhizienne modifient les structures bactériennes et fongiques dans les deux types de sol (stérilisé ou non), alors qu'aucun effet n'a été observé chez les Archées. Il est probable que la stérilisation permet à certaines communautés d'émerger pendant la recolonisation du sol. En effet, certaines communautés bactériennes (Bacillales, Sphingomonadales et TM7-1) et fongiques (Microascales, Orbiliales et Pezizales) sont plus abondantes dans le sol stérilisé par rapport au sol non stérilisé. D'après nos résultats, des communautés comme les Bacillales, Burkholderiales, Caulobacteriales, Elin 323, Rhizobiales, Rhodospirillales et Sphingomonadales pour les communautés bactériennes et Pezizales pour les communautés fongiques sont associés à la dissipation de PCDD/F qui est plus marquée dans le sol stérilisé végétalisé.

1 **Arbuscular mycorrhizal fungi - assisted phytoremediation of aged dioxin/furan-**
2 **contaminated soil: influence on rhizosphere microbial communities and on pollutant**
3 **dissipation**

Hacène MEGLOULI¹, Joël FONTAINE¹, Frédéric CHANGEY¹, Maryline MAGNIN-ROBERT¹, Benoît TISSERANT¹, Mohamed HIJRI², Anissa LOUNES-HADJ SAHRAOUI¹

4 ¹ Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV), Université du
5 Littoral Côte d'Opale, SFR Condorcet FR CNRS 3417, 50, Rue Ferdinand Buisson, 62228
6 Calais Cedex, France

7 ² Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques,
8 Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

9 * **Correspondence:** lounes@univ-littoral.fr (A. Lounès-Hadj Sahraoui)

10 **Keywords:** dioxin/furan, phytoremediation, mycorrhizal inoculation, sterilization, bacteria,
11 archaea, fungi, aged-contaminated soil

12 **Abstract**

13 The effect of different plant species (clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue, miscanthus and a
14 mixture of plants), arbuscular mycorrhizal inoculation and soil sterilization on the structure
15 and diversity of soil bacterial, archeal and fungal communities, and their role in the
16 phytoremediation of aged-dioxins/furans (PCDD/F) contaminated soil was carried out in
17 microcosm experiments. All of the plant species cultivated on the PCDD/F-aged
18 contaminated soil were able to grow and were colonized by arbuscular mycorrhizal fungi,
19 with a more efficient root colonization of autochthonous AMF inoculum compared to the
20 commercial one. Apparent negative impact of soil sterilization on microbial community was
21 observed with a decrease of bacterial, archaeal and fungal OTU number, richness and
22 diversity in non-sterilized soil compared to sterilized soil. The biotic capacity of the soil can
23 still be restored by microorganism re-colonization after sterilization, but not fully recovered
24 after 20 weeks. In detail, the abundance of some bacteria (such as Bacillales,
25 Sphingomonadales and TM7-1-affiliated sequences), and fungi with a high soil-recolonisation
26 capacity (Microascales, Orbiliales and Pezizales) were higher in sterilized soil compared to
27 the non-sterilized soil. In addition, whereas plant species and the mycorrhizal inoculation
28 affected bacterial and fungal community structures both in sterilized and non-sterilized soils,
29 no effect was observed on archaeal community. Bacillales, Burkholderiales, Caulobacteriales,

30 Elin 323, Rhizobiales, Rhodospirillales and Sphingomonadales for bacterial community and
31 Pezizales for fungal community were associated with the dissipation of PCDD/Fs.

32 **INTRODUCTION**

33 The development of urbanization, industrialization, transportation and energy production led
34 to an increasingly contaminated soils, air and water by metal trace elements and organic
35 pollutants, which threaten ecosystems, food safety and human health (Li et al., 2009). This
36 pollution has been attracting considerable public attention over the last decades and it is one
37 of the most challenging environmental problems as it negatively impacts the biological,
38 chemical and physical properties of soils (Miclean et al., 2010; Okparanma, 2013). Several
39 persistent organic pollutants (POP) are found in contaminated soils including chlorinated
40 compounds such as polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD) and polychlorinated
41 dibenzofurans (PCDF). Due to their structural stability, derived from two aromatic rings
42 containing one to eight chlorine atoms, PCDD/F are widespread in the environment and are
43 considered to be hazardous pollutants. These contaminants are harmful both for environment
44 and human health (immunotoxicity, neurotoxicity, carcinogenicity) (ATSDR, 1998; White
45 and Claxton 2004). They are unintentionally formed as by products during the manufacture of
46 a variety of halo aromatic compounds such as pesticides and chlorophenols, and also during
47 incineration of halogen-containing chemicals (Magharaj et al., 1997). Phytoremediation has
48 been recognized as an alternative method for the removal of organic pollutants from soil due
49 to its potentially lower cost and suitability for applications that require sustenance and low
50 maintenance (Cunningham et al., 1995). The effect of plant roots on the dissipation of organic
51 pollutants has been attributed mainly to selection of microbial communities with an increased
52 capacity of pollutant cleanup but also to improved physico-chemical soil conditions and
53 supply of root exudates for cometabolic processes (Liu et al., 2004; Cook and Hesterberg,
54 2013). The stimulated microorganisms use organic contaminants as carbon and/or energy
55 sources and in the process, partially, or completely breakdown these compounds into less
56 toxic or less available substrates in the environment (Reichenauer and Germida, 2008). The
57 degradation of PCDD/F includes aerobic, anaerobic and sequential anaerobic-aerobic
58 transformations.

59 Rhizosphere communities of different plant species growing in the same soil are often distinct
60 (Marschner et al., 2001). In fact, the bacterial, fungal and archaeal communities were
61 modulated by plant species, varieties, and development stages (Cadillo-Quiroz et al., 2010;
62 Singh et al., 2012; Chaparro et al., 2013; Huang et al., 2014). Plants can drive and shape the
63 selection of microbes by secreting specific root exudates (Bakker et al., 2012; Huang et al.,

64 2014). Therefore the selection of an appropriate set of plants, which are adapted to the
65 edaphic site conditions and which are able to enhance the soil microbial potential to degrade
66 the contaminants, is crucial for efficient soil remediation (Inui et al., 2008; Van Aken et al.,
67 2011). Many studies showed that successful phytoremediation is highly dependent on the
68 selection of an appropriate plant microbiome system (Fester et al., 2014; Hassan et al., 2014;
69 Thijs et al., 2016; Feng et al., 2017). A variety of plant species, such as alfalfa, tall fescue,
70 ryegrass, clover or plant mixture have been investigated and successfully used for the
71 remediation of chlorine contaminants (Wang and Oyaizu et al., 2009; Teng et al., 2010). In
72 addition to the plant genotype and the plant growth stage, other factors have been shown to
73 affect root exudation, such as plant nutritional status, root-associated bacteria and
74 colonization by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (Marschner and Timonen, 2006; Huang
75 et al., 2014). AMF, obligate symbionts that colonize the roots of more than 80% of the
76 terrestrial plants, provide some benefits to the host plant, by increasing plant mineral nutrition
77 and host plant resistance against pathogens and plant tolerance to various abiotic stresses,
78 including pollution (Smith and Read, 2008, Lenoir et al., 2016a). Thus, several investigations
79 showed that AMF can also facilitate plant establishment and survival in contaminated soil and
80 also influence the fate of some organic pollutants in the plant mycorrhizosphere (Binet et al.,
81 2000; Gao et al., 2011; Zhou et al., 2013; Nwoko, 2014, Lenoir et al., 2016b). Mycorrhizal
82 colonization can also influence the microbial community composition in the rhizosphere and
83 hyphosphere (the soil surrounding the extraradical hyphae). This effect may be explained by
84 AMF modulation of plant metabolisms (e.g. carbohydrate metabolism) with significant
85 modifications of root exudation quality with increasing secretions of nitrogen and phenolic
86 compounds or decreasing secretions of total sugars and phosphorous (Jones et al., 2004).
87 Furthermore, AMF themselves may exude substances that have a selective effect on the
88 microbial community. Indeed, extraradical hyphae provides a direct pathway for translocation
89 of photosynthetically derived carbon to the soil. The continuous provision of energy-rich
90 compounds, coupled with the large surface area of the hyphae that interact with the
91 surrounding soil environment provide important niches for bacterial colonization and growth
92 (Toljander et al., 2007).

93 The aim of this study was to determine the effect of different plant species (clover, alfalfa,
94 ryegrass, tall fescue, miscanthus and a mixture of plants), arbuscular mycorrhizal inoculation
95 and soil sterilization on the structure and diversity of soil bacterial, archeal and fungal
96 communities, and their role in the phytoremediation of aged-PCDD/F contaminated soil. Our
97 experimental design consisted on the use of irradiated and non-irradiated polluted soils in
98 microcosms. Soil sterilization suppressed indigenous microbes and constituted an interesting

99 matrix to test modulation of microbial community in our contaminated soil in response to
100 plants associated or not with AMF inoculum. Illumina MiSeq amplicon sequencing targeting
101 16S rDNA of Bacterial and Archea and ITS of Fungi was applied to assess microbial
102 communities in the rhizospheric soils.

103 MATERIALS AND METHODS

104 Experimental design and set-up

105 The soil used in this study was collected on 0-30 cm depth in December 2013 from a
106 contaminated site which is located at Halluin in northern France (50° 45' 53" N, 3° 7' 43" E),
107 near an old incineration plant in activity for thirty years. The polluted soil was dried, sieved to
108 2 mm and homogenized. While one fraction of the soil was sterilized by radiation (45 kGy,
109 gamma rays) (Ionisos company, Sablé-sur-Sarthe) to suppress indigenous AMF as well as
110 other microbes, the second one was not sterilized. The physico-chemical parameters of
111 sterilized and non-sterilized soils are presented in Table 1. Five AMF inoculated or non-
112 inoculated plant species : clover (*Trifolium pratense* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.),
113 ryegrass (*Lolium perenne* L.), Tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.), Miscanthus
114 (*Miscanthus×giganteus*) and commercial mixture of plant seeds (Rusti'Flore, Nova Flore,
115 Champigné, France) composed from *Lavatera trimestris* L., *Gypsophila elegans* Bieb.,
116 *Centaurea cyanus* L., *Linum grandiflorum* Desf., *Calendula officinalis* L., *Agrostemma*
117 *githago* L., *Cosmos bipinnatus* Cav., *Papaver rhoeas* L. and eight species confidential were
118 used to carry out phytoremediation microcosm experiments. The microcosms contained
119 sterilized or non-sterilized aged-polluted soil. The control microcosms were not vegetated and
120 contained sterilized or non-sterilized soils. Planted microcosms pot (400 mL, diameter 7.5
121 cm) were sown with five pre-germinated seeds of different species except Rusti'Flore and
122 miscanthus. Non-inoculated microcosms contained 270 g of polluted soil and 10% (w/w) of
123 Solrhize® a commercial inoculum consisting of a mixture of *Glomus* sp. (Agrauxin Ltd,
124 France) (10 propagules/g), sterilized by autoclave (121°C during 30 minutes). Inoculated
125 microcosms contained 270 g of the polluted soil and 10% of commercial AMF inoculum
126 Solrhize (Agrauxin Ltd, France) (10^3 propagules/g). As Rusti'Flore is composed of a mixture
127 of seeds, it was cultivated in trays containing 1800 g of polluted soil and 10% of AMF
128 inoculum. The pre-germinated rhizomes of miscanthus taken from an agricultural plot in
129 linzeux, France, was cultivated in pot containing 900 g of polluted soil and 10% of
130 mycorrhizal inoculum. For the sterilized soil, the indigenous micro-flora, except AMF spores,
131 was introduced by adding 10 ml per pot of non-sterile soil suspension filtered at 40 µm. The
132 experiment was set up with three replicates per treatment for 20 weeks of culture.

133 **Table 1** Physico-chemical parameters of the aged polluted sterilized and non-sterilized soils. Same letter indicate
 134 significant no difference between treatments according to the Mann-Whitney test ($P \leq 0.05$). Values are means \pm
 135 s.d. (n=3)

	Sterilized soil	Non-sterilized soil
Clay (g/kg)	135	135
Silt : Fine particle (g/kg)	149	149
Silt : Coarse particle (g/kg)	431	440
Sand : Fine particle (g/kg)	257	250
Sand : Coarse particle (g/kg)	28	26
Organic C (g/kg)	25.1	26.4
Total N (g/kg)	1.53	1.57
C/N	16.3	16.9
Organic matter (g/kg)	43.4	45.7
Total CaCO ₃ (g/kg)	<1	<1
P ₂ O ₅ (g/kg)	0.027	0.028
Mn (mg/kg)	415	462
Mn (cmol+/kg)	0.135	0.0631
Ca (g/100g)	0.565	0.567
Na (g/100g)	0.697	0.705
Al (g/100g)	3.74	3.97
Al (cmol+/kg)	0.0469	0.0281
Fe (g/100g)	2.06	2.16
Fe (cmol+/kg)	0.0089	0.0052
Si (g/100g)	0.207	0.204
Mg (g/100g)	0.281	0.292
Mg (cmol+/kg)	1.06	1.07
pH	6.34	6.42
PCDD/F (ng/kg)	208 \pm 40 ^a	185 \pm 17 ^{ab}

136 **Determination of plant biomass**

137 After 20 weeks of culture, roots and shoots of AMF inoculated or non-inoculated plant
 138 species (clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue, miscanthus) and Rusti'Flore were collected.
 139 Roots were rinsed with sterile water. Shoots and roots were lyophilized during 48 hours until
 140 constant weight to obtain dry biomass values except for Rusti'Flore, its biomass per plant is
 141 not determined in this experiment. Three individual pots were used as biological replicates per
 142 treatment.

143 **AMF root colonization**

144 After 20 weeks of culture, AMF root colonization rates were determined by microscopic
 145 observation (Olympus BX40F, Japan). To quantify AMF root colonization, fresh roots were
 146 cleared in KOH 10 % solution (v/v) for 1 h at 70 °C and then stained with trypan blue (0.05

147 %) in a water, glycerol and lactic acid mixture (1:1:1, v/v/v) for 1 h at 70 °C (Phillips and
148 Hayman 1970). The stained root fragments were stored in a water/glycerol/lactic acid (1:1:1,
149 v/v/v) solution until observation. Root colonization was evaluated using the grid line intersect
150 method (McGonigle et al., 1990). 135 root fragments from three different pots were observed
151 under an optical microscope ($\times 100$ magnification). 3 intersections per root fragment were
152 examined. In total, more than 400 observations per treatment were analyzed, and total
153 mycorrhizal colonization was estimated.

154 **Dioxin/furan analysis**

155 The determination of residual levels of dioxins/furans in microcosm soil refers to EPA
156 Method 8290. 10 g of lyophilized soil and crushed to 2 mm were extracted. The extractions
157 were performed using a commercial service provided by ASE Mode (Accelerated Solvent
158 Extraction) with toluene, under heat (50°C) and pressure (103 bars). The levels of PCDD/F
159 were determined by gas chromatography equipped with a high-resolution mass spectrometry
160 detector (GC / HRMS). All samples were analyzed for 17 PCDD/F congeners recommended
161 by the World Health Organization (WHO, 2005) and 3 replicates per treatment were used.

162 **DNA extraction**

163 Soil genomic DNA was extracted from 250 mg of soil using the Nucleospin® Soil
164 (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol. Quality of soil
165 DNA extractions were checked by electrophoresis on 1% agarose images of gels stained with
166 GelRed (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) were captured with Gel Doc (BioRad, USA).
167 All DNA extracts were diluted to 0.5 ng/ μ L for subsequent analyses.

168 **Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit (Invitrogen)**

169 Extracted DNA concentration was quantified with Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity
170 Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). DNA concentrations were carried out according to the
171 protocol with High Sensitivity Quant-iT™ kit (Molecular Probes, Invitrogen, Paisley, UK)
172 using a 96-well plate. Two μ l of samples corresponding to 1ng DNA per reaction were
173 pipetted into plate with SyBrGreen Mix. 5 μ L of eight DNA standards were added to the
174 plate, to generate a standard curve with a final concentration range of 0-50 ng/mL. The
175 fluorescence was measured under a StepOne™ Real-Time PCR System (excitation 485 nm,
176 emission 517 nm). From the data produced, a standard curve was plotted in Sigma Plot and
177 the concentration of all samples calculated.

178

179 **PCR and Amplicon sequencing**

180 PCR amplification of 16S rDNA of Bacteria and Archaea were performed using respectively
 181 primer pairs 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 805R (5'-
 182 GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'), ARCH517F (5'-GCYTAAAGSRNCCGTAGC-3')
 183 and ARCH909R (5'-TTTCAGYCTTGCGRCCGTAC-3'), and fungal ITS regions was
 184 performed by using ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) and 58A2R (5'-
 185 CTGCGTTCTTCATCGAT-3'). PCR reactions were achieved in a volume of 25µl containing
 186 0.2 mM of dNTP, 0.6 µM of each primer, 1,25 µl of DMSO, 1 ng of DNA and 0.5U of *Taq*
 187 DNA polymerase (Roche, Mississauga, ON). PCR were run in a thermocycler using the
 188 following parameters: initial denaturation at 94°C for 2 min, 30 cycles of 94°C for 30 sec,
 189 55°C for 30 sec, 72°C for 30 sec and a final elongation at 72°C for 7 min. PCR reaction,
 190 Barcode multiplexing and Illumina MiSeq were performed at the Genoem Quebec Innovation
 191 Center at McGill University (Montreal, QC).

192 **Bioinformatic analysis**

193 The Illumina datasets were processed as described in Brazilian Microbiome Project
 194 (<http://www.brmicrobiome.org/16s-profiling-pipeline-illumina>) with some modifications. The
 195 partial 16S rRNA gene and ITS sequences were processed in Mothur (v.1.34.4) (Schloss et
 196 al., 2009) and QIIME (v.1.9.1) (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et
 197 al., 2010). The first part of the pipeline was performed in mothur, it is composed of five steps:
 198 i) forward and reverse sequences reads were merged within the *make.contigs* command, ii)
 199 trim off primers with *trim.seqs* command, and iii) *unique.seqs* command was used for remove
 200 singletons, iv) finally, merged file was separated into individual files for use in QIIME. The
 201 next part was performed in QIIME. Sequences were chimera checked against the gold.fa
 202 database (<http://drive5.com/uchime/gold.fa>) and clustered into Operational Taxonomic Units
 203 (OTUs) according to their sequence similarity (97%) using the USEARCH v8.1. Reads were
 204 first clustered against the Greengenes_13_8 16S rRNA gene database for bacteria and
 205 archaea) and the HMM ITS rRNA gene database for fungi. Taxonomy was assigned to the
 206 representative sequence of each OTUs using uclust with the Green genes 16S rRNA gene
 207 database and HMM ITS rRNA gene database. Datasets were randomly standardized by
 208 subsampling to the sample size that showed the lowest number of reads. Relative abundances
 209 were calculated with Excel on the different datasets to visualize the percentage of the
 210 taxonomic affiliations across AMF inoculation and plant species. All Illumina MiSeq
 211 databases generated in this study were deposited in the NCBI Sequence Read Archive and are
 212 available under the project number (..)

213 **Statistical analysis**

214 Data were analyzed statistically by means of comparison by Mann-Whitney test using,
215 XLSTAT 19.1. Different letters following values indicate statistically significant differences
216 between different treatments. Data of colonization percentages were converted to arcsine
217 values before Mann-Whitney test. Standard deviations were calculated by Microsoft Office
218 Excel 2007 for all data. In order to relate the changes in microbial community composition to
219 environmental variables, redundancy analysis (RDA) was used as implemented in the
220 CANOCO 4.5 software package (Biometris, Wageningen, The Netherlands).

221 **RESULTS**

222 **Mycorrhizal rate and plant biomass**

223 In sterilized soil, no mycorrhizal structures were observed in the roots of the different plant
224 species cultivated on the non-inoculated polluted soil after 20 weeks of culture. The
225 mycorrhizal root colonizations were estimated at 28, 32, 34, 45, 51 and 66% in inoculated tall
226 fescue, alfalfa, miscanthus, clover, ryegrass and Rusti'Flore, respectively (Table 2).
227 Moreover, spontaneous root colonizations by indigenous AMF were observed in non-
228 sterilized soil. The lowest mycorrhizal rate was obtained with miscanthus (42%), followed by
229 clover (50%), tall fescue (57%), ryegrass (60%), alfalfa (68%) and Rusi'Flore (80%).
230 Amendment with commercial mycorrhizal inoculum increased significantly the mycorrhizal
231 rate in clover ($P=0.043$) by 26.5% compared to non-inoculated clover, while no
232 improvements of mycorrhizal root colonization were observed with other plant species. The
233 sterilization have a significant impact on the plant colonization by the AMF, the mycorrhizal
234 root rate was significantly more important in the plant cultivated on non-sterilized soil than on
235 sterilized one, the mycorrhizal colonization rate was decreased by 23% for Rusti'Flore
236 ($P=0.005$) by 28% for ryegrass ($P=0.005$), by 51% for tall fescue ($P=0.005$) and by 54% for
237 alfalfa ($P=0.013$).

238 In sterilized soil, mycorrhizal inoculation provided significant growth effects only on shoot
239 tissues of three tested plants (Table 2): an increase of biomass by 31% for clover ($P=0.021$)
240 and 41% for alfalfa ($P=0.049$) and a significant decrease of 25% in shoot dry weight for
241 ryegrass ($P=0.048$). In non-sterilized soil, mycorrhizal inoculation only increased the shoot
242 dry weight of alfalfa by 63%. After 20 weeks of culture, plants showed a significantly
243 improved growth in sterilized soil compared to non-sterilized soil (Table 2), for 3 of 5 plants
244 where biomasses were evaluated. In details, significant increases in shoot and root dry weight
245 of non-inoculated alfalfa ($P=0.000$, $P<0.0001$ respectively) (400% and 390% respectively),

246 ryegrass ($P=0.006$, $P<0.0001$ respectively) (120% and 130%) and tall fescue ($P<0.0001$,
 247 $P<0.0001$) (230% and 150%) respectively, were observed in sterilized soil.

248 **Table 2** Total mycorrhizal root colonization in clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue, Rusti'Flore and miscanthus,
 249 and root and shoot dry weights of clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue and miscanthus in the presence or not of
 250 mycorrhizal inoculum after 20 weeks of culture in microcosms containing aged polluted sterilized or non-
 251 sterilized soils. P -values for Mycorrhizal rate, root and shoot dry weight (AMF inoculation and sterilization)
 252 according to Mann-Whitney test. The bolded values are significant at $P<0.05$.

Soil		Clover	alfalfa	ryegrass	tall fescue	Rusti'Flore	miscanthus	
Mycorrhizal rate (%)	Sterilized	Non-inoculated	0	0	0	0	0	
		Inoculated	46±12	32±7	51±1	28±7	66±4	34±12
	Non-sterilized	Non-inoculated	50± 2	68 ± 8	60 ± 11	57 ± 7	80 ± 6	42 ± 8
		Inoculated	68± 9	70 ± 9	71 ± 9	57 ± 7	83 ± 3	43 ± 15
Root dry weight (mg/plant)	Sterilized	Non-inoculated	33±9	54±16	105±2	131±59	-	1634±113
		Inoculated	48±7	74±46	55±16	199±143	-	1491±73
	Non-sterilized	Non-inoculated	48 ± 24	11 ± 3	46 ± 14	39 ± 8	-	1331 ± 400
		Inoculated	45 ± 13	23 ± 8	37 ± 9	32 ± 8	-	1664 ± 276
Shoot dry weight (mg/plant)	Sterilized	Non-inoculated	292±45	193±36	157±23	163±14	-	3268±178
		Inoculated	383±39	272±100	118±7	246±125	-	3968±144
	Non-sterilized	Non-inoculated	295±35	38 ± 6	72 ± 6	65 ± 11	-	3629 ± 576
		Inoculated	323± 56	102 ± 41	73 ± 18	50 ± 12	-	4087 ± 1249
Mycorrhizal rate	AMF inoculation	0.043	0.872	0.076	1.000	0.511	0.872	
	Sterilization	0.065	0.013	0.005	0.005	0.005	0.748	
Root dry weight	AMF inoculation	0.121	0.345	0.064	0.850	NC	0.385	
	Sterilization	0.734	0.001	0.006	<0.0001	NC	0.850	
Shoot dry weight	AMF inoculation	0.021	0.049	0.048	0.970	NC	0.427	
	Sterilization	0.140	<0.0001	<0.0001	<0.0001	NC	0.734	

253

254 Diversity of rhizosphere microbial communities

255 Sequence processing and quality filtering allowed to obtain 325079 16S rDNA reads for
 256 Bacteria in the sterilized soil. They were clustered into 3048 OTUs (after excluding
 257 singletons). Number of reads per sample ranged from 5756 to 13813. For fungi, we obtained a
 258 total of 1449421 ITS reads that were clustered into 101729 OTUs (after excluding singletons)
 259 using a 97% sequence similarity cutoff. Number of reads per sample ranged from 7610 to
 260 79482. For Archaea, we obtained 548336 16S rDNA reads that were clustered into 26 OTUs
 261 (after excluding singletons). Number of reads per sample ranged from 3753 to 28989.

262 In non-sterilized soil, we obtained 324282 16S rDNA reads for Bacteria that were clustered
 263 into 5263 OTUs (after excluding singletons). Number of reads per sample ranged from 5471
 264 to 13774. For fungi, we obtained a total of 1155902 ITS reads that were clustered into 19010
 265 OTUs (after excluding singletons). Number of reads per sample ranged from 11759 to 54968.

266 For Archaea, we obtained 1457168 16S rDNA reads that were clustered into 48 OTUs (after
267 excluding singletons). Number of reads per sample ranged from 6504 to 52678.

268 The number of OTUs of bacteria was significantly higher in non-sterilized soil (1186 to 1500
269 OTUs observed) compared to sterilized soil (623 to 824 OTUs) (Table 3A and 3B), regardless
270 of the treatment conditions, ($P=0.005$ for non-vegetated, $P=0.005$ for alfalfa, $P=0.002$ for
271 clover and ryegrass, $P=0.002$ for Rusti'Flore and $P=0.045$ for tall fescue). Similarly, the
272 OTUs richness (Chao1 estimator) was also significantly higher in the non-sterilized soil (1424
273 to 1616) compared to sterilized soil (751 to 938) regardless of the treatment conditions (Table
274 3A and 3B) ($P=0.002$ for non-vegetated, $P=0.002$ for clover, alfalfa, ryegrass and Rusti'Flore
275 and $P=0.045$ for tall fescue). Shannon index varied among the two types of soils (sterilized
276 and non-sterilized), regardless of the treatment conditions ($P=0.002$ for non-vegetated, clover,
277 alfalfa, ryegrass, Rusti'Flore, and $P=0.045$ for tall fescue). However, we observed a
278 significant effect of mycorrhizal inoculation on bacterial richness (Chao1 estimator) in alfalfa
279 sterilized-soil ($P=0.002$), while no significant effect of mycorrhizal inoculation was observed
280 on the bacterial OTUs, the bacterial richness (Chao1 estimator) and the bacterial diversity
281 (Shannon index) (Table 4) for other plants.

282 In sterilized soil, bacterial community composition was positively impacted by vegetation in
283 both inoculated and non-inoculated plants. We found 13%, 23%, 24%, 27% and 32% more
284 OTUs of bacteria in soils non-inoculated and planted with alfalfa, Rusti'Flore, tall fescue and
285 clover respectively in comparison to the non-planted soil, while an increase of OUT number
286 of 13%, 18%, 24%, 31% and 39% was observed in soils inoculated and planted with ryegrass,
287 Rusti'Flore, alfalfa, clover and tall fescue, respectively, compared to the non-planted and
288 inoculated soils (Table 4). Similar pattern was also observed for bacterial richness. Chao1
289 estimator predicted 12% of increased bacterial richness in non-inoculated and planed alfalfa
290 soil, 20% in non-inoculated and planted with clover and non-inoculated and planted with
291 Rusti'Flore, 14% in inoculated and planted with Rusti'Flore, 18% in inoculated and planted
292 with clover and 28% in inoculated and planted with alfalfa. However, bacterial diversity
293 (Shannon index) was not affected by vegetation. Introduced commercial mycorrhizal
294 inoculant led to 16% increase in bacterial richness (Chao1 estimator) in soil planted with
295 alfalfa (Table 4).

296

297

298 **Table 3** Alpha diversity metrics for rhizosphere samples collected from sterilized (A) or on non-sterilized (B)
 299 aged-polluted soil, non-vegetated and vegetated with different plant species (clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue
 300 and Rusti'Flore) and inoculated or not with commercial AMF.

301 A)

		Observed OTUs		Chao1 richness estimate		Shannon diversity index		
		Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	
Sterilized soil	Bacteria	non-vegetated	623 ± 37	656±50	763 ± 34	771 ± 35	7.5 ± 0.17	7.3 ± 0.36
		clover	824 ± 63	858±38	919 ± 69	907 ± 29	7.4 ± 0.21	7.4 ± 0.05
		alfalfa	772 ± 21	815±26	854 ± 6	991 ± 32	7.7 ± 0.21	7.5 ± 0.28
		ryegrass	706 ± 23	741±57	751 ± 50	831 ± 83	7.1 ± 0.15	6.8±0.19
		tall fescue	792 ± 155	915±34	938 ± 188	1110 ± 49	7.7 ± 0.71	7.8 ± 0.23
		Rusti'Flore	775 ± 48	774±53	916 ± 104	881 ± 67	7.9 ± 0.08	7.5 ± 0.01
	Fungi	non-vegetated	669 ± 374	544 ± 127	9732 ± 4822	14593 ± 9458	2.6 ± 0.17	3.2 ± 1.04
		clover	441 ± 209	588 ± 316	11543 ± 3847	14504 ± 4800	2.6 ± 0.24	3.4 ± 0.23
		alfalfa	273 ± 237	826±252	11059 ± 3830	22689±6247	2.6 ± 0.85	3.7 ± 0.17
		ryegrass	298 ± 212	783 ± 248	11681 ± 2515	41085 ± 1796	1.8 ± 0.60	3.3 ± 0.17
		tall fescue	265 ± 99	736 ± 92	12635 ± 11018	18203 ± 6698	2.9 ± 0.44	3.2 ± 0.78
		Rusti'Flore	600 ± 210	794 ± 116	9286 ± 1970	16926 ± 7617	3.1 ± 0.22	3.6 ± 0.18

302 B)

		Observed OTUs		Chao1 richness estimate		Shannon diversity index		
		Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	
Non-sterilized soil	Bacteria	non-vegetated	1186 ± 156	1143 ± 24	1424 ± 170	1447 ± 61	8.7 ± 0.09	8.8±0.06
		clover	1500 ± 128	1488 ± 41	1603 ± 114	1690 ± 15	8.8 ± 0.05	8.8±0.06
		alfalfa	1338 ± 55	1286 ± 81	1608 ± 88	1633 ± 101	8.9 ± 0.07	8.9 ± 0.10
		ryegrass	1383 ± 17	1387 ± 109	1616 ± 96	1584 ± 78	8.7 ± 0.14	8.8 ± 0.10
		tall fescue	1359 ± 106	1061 ± 253	1601 ± 46	1285 ± 437	8.9 ± 0.09	8.4 ± 0.98
		Rusti'Flore	1275 ± 198	1211±135	1573 ± 132	1495 ± 94	9 ± 0.04	8.8 ± 0.30
	Fungi	non-vegetated	715 ± 71	914 ± 94	1376 ± 204	1681 ± 310	6.7 ± 0.15	6.9±0.73
		clover	969 ± 98	876 ± 69	1346 ± 182	1340±224	6.4 ± 0.29	6.5±0.91
		alfalfa	863 ± 176	903±44	1399 ± 149	1436±259	4.9 ± 0.54	6.5±0.85
		ryegrass	839 ± 126	811 ± 176	1239 ± 116	1754±678	5.9 ± 1.20	5.8 ± 0.99
		tall fescue	644 ± 78	768 ± 458	1207 ± 13	1483±31	6.1 ± 0.55	4.6 ± 2.57
		Rusti'Flore	1382 ± 192	755 ± 78	1495 ± 344	929 ± 87	4.9 ± 1.36	4.2 ± 0.82

303

304 By contrast, in the non-sterilized soil, three plants significantly influenced the numbers of
 305 bacterial OTUs, where an increase of 13%, 16% and 26% in non-inoculated alfalfa, ryegrass
 306 and clover we observed in comparison to non-vegetated soil, and by 12.5%, 21% and 30% in
 307 inoculated alfalfa, ryegrass and clover respectively. Similarly the bacterial richness predicted
 308 12.6% of higher richness in the presence of non-inoculated clover, alfalfa and ryegrass, and
 309 10%, 13% and 17% in inoculated ryegrass, alfalfa and clover respectively, compared with
 310 non-planted soil. The number of bacterial OTUs and the bacterial richness and diversity was

311 neither significantly influenced by the commercial mycorrhizal addition with plants tested in
 312 non-sterilized soil in comparison to non-inoculated soil with the presence of plants coverage
 313 in our conditions of cultures (Table 4).

314 **Table 4:** *P* values for OTUs, Chao1 richness estimate and Shannon diversity index on sterilized and non-
 315 sterilized soil depends on Mycorrhizal inoculation, Vegetation and Sterilization, according to Mann-Whitney
 316 test. The bolded values are significant at $P < 0.05$.

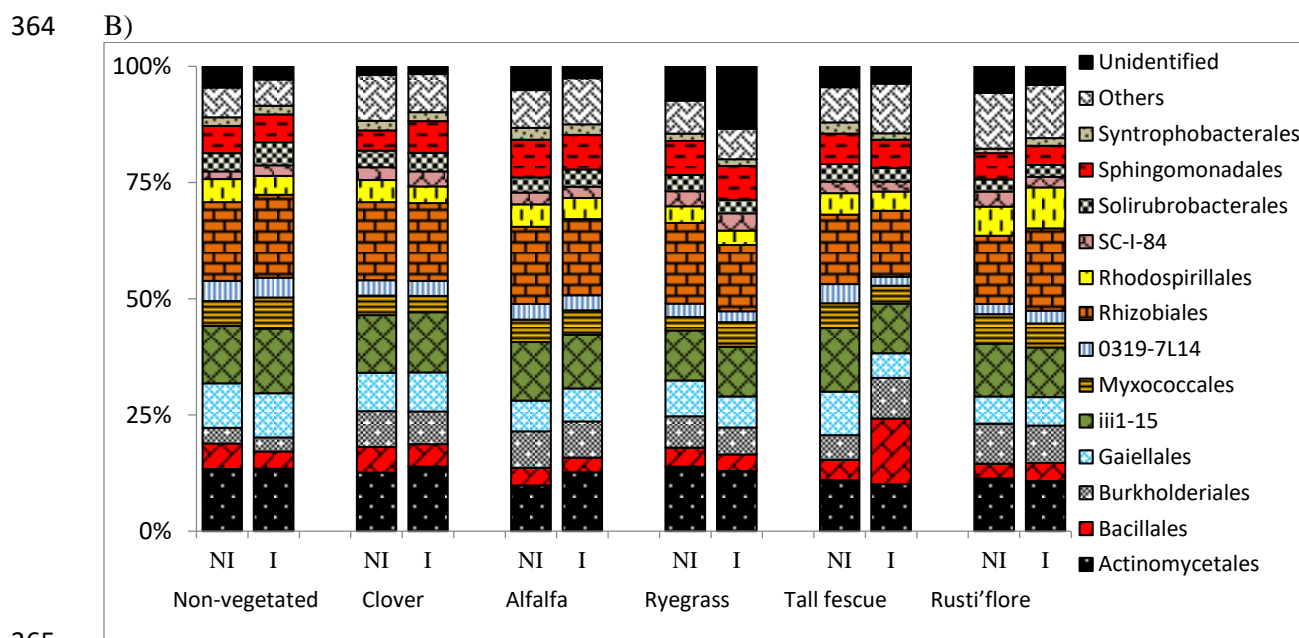
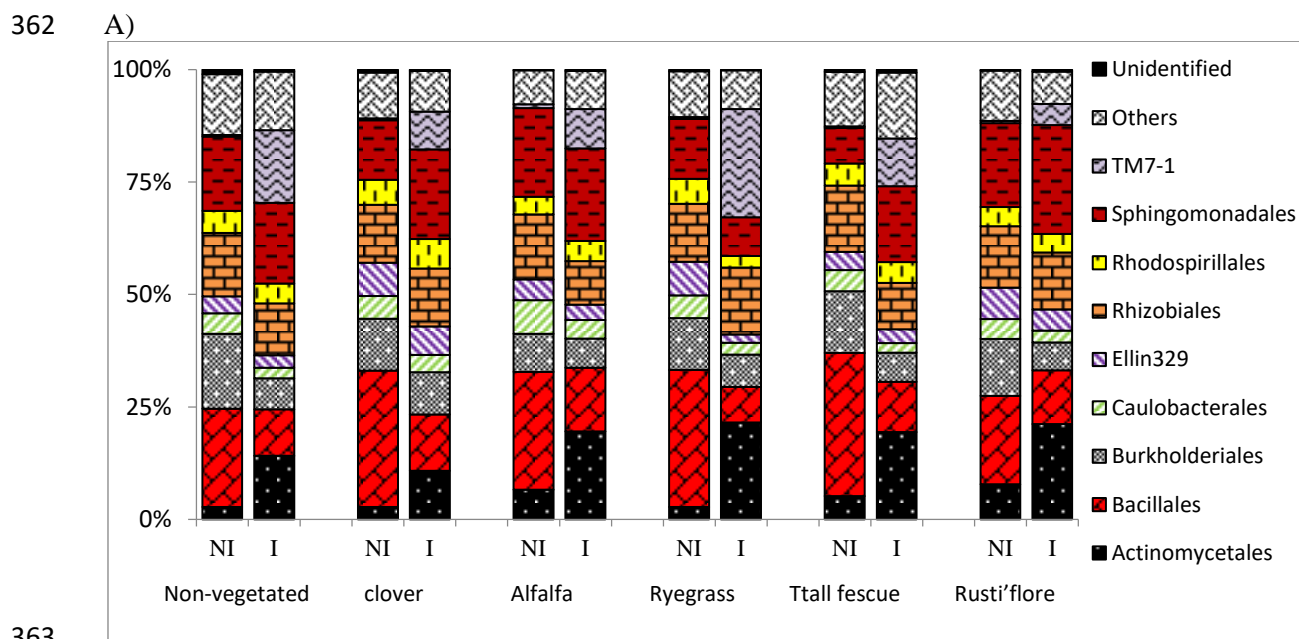
Observed OTUs			non-vegetated	clover	alfalfa	ryegrass	tall fescue	Rusti'Flore
Bacteria	Sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.507	0.663	0.121	0.663	0.383	1.000
		Vegetation	NC	0.005	0.005	0.013	0.020	0.005
	Non-sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	1.000	1.000	0.663	0.663	0.100	1.000
		Vegetation	NC	0.002	0.020	0.008	0.230	0.378
	Sterilization			0.005	0.002	0.005	0.002	0.045
Fungi	Sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.663	0.663	0.100	0.190	0.010	0.383
		Vegetation	NC	0.378	0.810	0.810	0.689	0.378
	Non-sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.100	0.383	1.000	1.000	0.663	0.006
		Vegetation	NC	0.128	0.471	0.936	0.378	0.298
	Sterilization			0.128	0.020	0.066	0.230	0.378
Chao1 richness estimate			non-vegetated	clover	alfalfa	ryegrass	tall fescue	Rusti'Flore
Bacteria	Sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	1.000	1.000	0.002	0.383	0.383	0.383
		Vegetation	NC	0.002	0.002	0.810	0.066	0.002
	Non-sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.663	0.383	1.000	1.000	0.100	0.663
		Vegetation	NC	0.013	0.020	0.031	0.230	0.173
	Sterilization			0.002	0.002	0.002	0.002	0.045
Fungi	Sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.663	0.663	0.100	0.010	0.663	0.383
		Vegetation	NC	0.810	0.471	0.173	0.575	0.689
	Non-sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.383	1.000	1.000	0.190	0.010	0.100
		Vegetation	NC	0.230	0.689	0.471	0.378	0.128
	Sterilization			0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
Shannon diversity index			non-vegetated	clover	alfalfa	ryegrass	tall fescue	Rusti'Flore
Bacteria	Sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.663	0.663	0.383	0.100	0.663	0.100
		Vegetation	NC	0.936	0.173	0.131	0.128	0.066
	Non-sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.383	1.000	1.000	1.000	0.383	0.383
		Vegetation	NC	0.936	0.173	0.936	0.128	0.093
	Sterilization			0.002	0.002	0.002	0.002	0.045
Fungi	Sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.383	0.019	0.100	0.017	1.000	0.100
		Vegetation		0.936	0.575	0.575	0.936	0.298
	Non-sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.663	0.663	0.100	1.000	1.000	0.663
		Vegetation	NC	0.378	0.093	0.065	0.020	0.008
	Sterilization			0.002	0.066	0.002	0.066	0.066

317
 318 Similarly to the bacterial diversity, the number of fungal OTUs was higher in non-sterilized
 319 soil compared with sterilized soil in clover ($P=0.020$). However, fungal OTUs richness
 320 (Chao1 estimator) and the fungal OTUs diversity (Shannon index) provided highly variable

321 indices among the two types soil. The fungal richness was significantly higher in sterilized
322 soil (9286 to 12635) compared to non-sterilized soil (1207 to 1495) regardless of the
323 treatment conditions, for non-vegetated, clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue and Rusti'Flore
324 ($P=0.002$). Unlike the fungal richness, fungal diversity was significantly higher in non-
325 sterilized soil compared to sterilized soil especially in non-vegetated soil ($P=0.002$), alfalfa
326 ($P=0.002$) and Rusti'Flore ($P=0.045$) (Table 4). In sterilized soil, the number of fungal OTUs,
327 fungal richness (Chao1 estimator) and diversity (Shannon diversity) weren't significantly
328 influenced by plants cover after 20 weeks of culture in our conditions (Table 5). The
329 inoculation of commercial AMF in planted soils led to a significant increase in the number of
330 fungal OTUs with the presence of tall fescue ($P=0.010$) by 2.8-fold. In parallel to high level
331 of fungal OTUs number, fungal richness (Chao1 estimator) was significantly increased by
332 mycorrhizal inoculation in ryegrass ($P=0.010$) by 3.5-fold and diversity (Shannon index)
333 appeared to be positively affected by mycorrhizal inoculation only with the presence of clover
334 ($P=0.019$ by 1.3-fold) and ryegrass ($P=0.017$ by 1.8-fold, Table 4). In non-sterilized soil,
335 fungal OTUs and richness (Chao1 estimator) were not affected by plantation. However,
336 fungal diversity (Shannon) was decreased by vegetation, by 27%, in non-inoculated
337 Rusti'Flore and by 33% in inoculated tall fescue. The inoculation of commercial AMF on
338 Rusti'Flore led to a significant decrease of fungal OTUs by 45% compared to non inoculated
339 Rusti'Flore ($P=0.006$), and a significant increase of fungal richness (Chao1 estimator) by
340 23% in the presence of tall fescue ($P=0.010$). Similarly to the bacterial and fungal
341 communities, the number of archaeal OTUs was higher in non-sterilized soil (26 to 31 OTUs)
342 compared to the sterilized soil (9 to 13 OTUs), regardless of the treatments (Supplementary
343 Table 1), ($P=0.002$ for non-vegetated, $P=0.002$ for alfalfa, $P=0.002$ for clover and $P=0.002$
344 for ryegrass, $P=0.045$ for tall fescue and $P=0.001$ for Rusti'Flore). The Chao1 estimator of
345 archaeal OTUs richness and the Shannon index of archaeal OTUs diversity provided highly
346 variable indices among the two types soil. The archaeal richness (Chao1 estimator) was
347 significantly higher in non-sterilized soil (25 to 28) compared to sterilized soil (8 to 12)
348 regardless of the treatment conditions, non-vegetated clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue and
349 Rusti'Flore ($P=0.002$, 0.001, 0.002, 0.002, 0.002 and 0.001) (Supplementary Tables 1 and 2) .
350 Archaeal diversity (Shannon index) was also significantly higher in non-sterilized soil (1.5 to
351 2.9) compared to sterilized soil (0.7 to 1.4) especially in clover ($P=0.030$), ryegrass ($P=0.002$)
352 and Rusti'Flore ($P=0.001$) (Supplementary Tables 1 and 2). In both sterilized and non-
353 sterilized soil, the number of archaeal OTUs, archaeal richness (Chao1 estimator) and
354 diversity (Shannon index) weren't significantly influenced by plantation and plant species, nor
355 by mycorrhizal inoculation after 20 weeks of culture (Supplementary Tables 1 and 2).

356 **Rhizosphere microbial community composition in soils**

357 Taxonomic assignment of OTUs allowed us to identify at least 9 and 13 dominant bacterial
 358 orders in the sterilized and non-sterilized soils, respectively (Figure 1A and 1B). After 20
 359 weeks of plants growth on sterilized soil, the bacterial community was dominated by
 360 members of the order Bacillales (22%), Burkholderiales (17%), Sphingomonadales (16.5%)
 361 and Rhizobiales (14%) in sterilized soil (Figure 1A).



366 **Figure 1** Relative abundance of major bacterial orders from aged polluted sterilized soils (A) and non-sterilized
 367 soil (B) cultivated in the presence of clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue and rusti'flore inoculated (I) or not (NI)
 368 by commercial AMF after 20 weeks of culture.

369 Moreover, Mann-Whitney test showed the impact of “sterilization treatment” on these four
 370 orders, with the increase of relative abundance of Bacillales ($P<0.0001$), Burkholderiales
 371 ($P=0.001$) and Sphingomonadales ($P<0.0001$) and the decrease of Rhizobiales ($P<0.0001$)
 372 (Table 5). In sterilized soil (Figure 1A), no effect of vegetation on the relative abundances of
 373 the different bacterial orders were observed. However, plant species had an effect on the
 374 relative abundance of dominant orders, such as Sphingomonadales ($P=0.001$),
 375 Rhodospirillales ($P=0.000$) and Ellin 329 ($P=0.000$) (Table 5).

376 **Table 5:** P values for community structures of Bacteria, depends on vegetalization, AMF inoculation and
 377 sterilization according to Mann-Whitney, (plant species) according to Kruskal-Wallis. The bolded values are
 378 significant at $P<0.05$.

	Bacteria	Vegetalization	Plant species	AMF inoculation	Sterilization
Sterilized soil	TM7-1	0.949	0.737	<0.0001	NC
	Sphingomonadales	0.596	0.001	0.033	<0.0001
	Rhodospirillales	0.195	0.000	0.692	0.395
	Rhizobiales	0.783	0.101	0.002	<0.0001
	Ellin329	0.210	0.000	0.060	NC
	Caulobacterales	0.361	0.146	<0.0001	NC
	Burkholderiales	0.458	0.435	<0.0001	0.001
	Bacillales	0.408	0.940	<0.0001	<0.0001
	Actinomycetales	0.298	0.355	<0.0001	0.178
Non-sterilized soil	0319-7L14	0.001	0.211	0.189	NC
	Syntrophobacterales	0.915	0.014	0.169	NC
	Sphingomonadales	0.511	0.010	0.937	<0.0001
	Solirubrobacterales	0.001	0.029	0.624	NC
	SC-I-84	0.010	0.067	0.669	NC
	Rhodospirillales	1.000	0.003	0.110	0.395
	Rhizobiales	0.048	0.075	0.937	<0.0001
	Myxococcales	0.010	0.020	0.987	NC
	iii1-15	0.361	0.568	0.764	NC
	Gaiellales	0.001	0.008	0.261	NC
	Burkholderiales	<0.0001	0.088	0.837	0.001
	Bacillales	0.408	0.018	0.289	<0.0001
Actinomycetales	0.111	0.003	0.141	0.178	

379 Thus, the relative abundance of Sphingomonadales were more abundant in alfalfa and
 380 Rusti’Flore samples (19%) than with clover and ryegrass (13%) and tall fescue (8%).
 381 Rhodospirillales were more abundant in clover and ryegrass samples (5.5%) than in soil
 382 cultivated with tall fescue and Rusti’Flore (4.5%) and alfalfa (3.8%). Ellin 329 were more
 383 abundant in clover, ryegrass and Rusti’Flore (7%) than with alfalfa and tall fescue (4%).
 384 Surprisingly, apparent modulations of bacterial community were observed in non-vegetated
 385 soil inoculated with commercial AMF and particularly the increase of Actinomycetales order
 386 (5-fold) and TM7-1 class (44-fold); and the decrease of Bacillales (2-fold) and 7
 387

388 Burkholderiales order (7-fold) (Figure 1A). Adding mycorrhizal inoculum to the plants
 389 modified significantly the relative abundance of Actinomycetales ($P<0.0001$), Bacillales
 390 ($P<0.0001$), Burkholderiales ($P<0.0001$), Caulobacteriales ($P<0.0001$), Rhizobiales ($P=0.002$),
 391 Sphingomonadales ($P=0.033$) and TM7-1 ($P<0.0001$). In details, mycorrhizal inoculation
 392 increased significantly Actinomycetales and TM7-1 abundant in all plant species tested.
 393 Sphingomonadales in all plant species except in ryegrass, where their abundance decreases.
 394 Moreover, Rhizobiales orders increased in the soil cultivated with inoculated ryegrass. The
 395 negatively impacts were observed for mycorrhizal inoculation treatment on Bacillales,
 396 Burkholderiales, Caulobacteriales whatever the plant species tested. Moreover, significant
 397 decrease of Rhizobiales abundant was observed in soil cultivated with inoculated clover,
 398 alfalfa, tall fescue and Rusti'Flore. The percentage of unidentified bacteria estimated was
 399 higher in non-sterilized soil in comparison to sterilized ones. In non-sterilized soil, the
 400 Rhizobiales (18%), Actinomycetales (14%), iii1-15 (13%), Gaiellales (10%), Bacillales (6%),
 401 and Sphingomonadales (6%) were the dominant orders identified (Figure 1B). The plantation
 402 effect on bacterial community was observed on different orders, where we observed a
 403 significant decrease of Gaiellales relative abundance ($P=0.001$), Myxococcales ($P=0.010$),
 404 Rhizobiales ($P=0.048$), Solirubrobacteriales ($P=0.001$) and 0319-7L14 ($P=0.001$), and
 405 significant increase of Burkholderiales ($P<0.0001$) and SC-I-84 ($P=0.010$) in planted soil
 406 compared to non-vegetated soil (Figure 1B and Table 5). Plant species had also an effect on
 407 the relative abundance of dominant orders, such as Actinomycetales ($P=0.003$), Bacillales
 408 ($P=0.018$), Gaiellales ($P=0.008$), Myxococcales ($P=0.020$), Rhodospirillales ($P=0.003$),
 409 Solirubrobacteriales ($P=0.029$), Sphingomonadales ($P=0.010$), and Syntrophobacteriales
 410 ($P=0.014$). Thus, the relative abundance of Actinomycetales were more abundant in ryegrass
 411 (15%) than clover and tall fescue (12%) and alfalfa (10%). Bacillales were more abundant in
 412 clover (6%) than alfalfa, tall fescue and ryegrass (4%) and Rusti'Flore (3%). Gaiellales were
 413 more abundant in tall fescue (10%) than clover and ryegrass (8%) and Rusti'Flore (6%).
 414 Myxococcales were more abundant in tall fescue and Rusti'Flore (6%) than clover and alfalfa
 415 (4.5%) and ryegrass (3%). Rhodospirales were more abundant in Rusti'Flore (6.5%) than
 416 alfalfa, tall fescue and clover (5%) and ryegrass (3.8%). Solirubrobacteriales were more
 417 abundant in tall fescue, clover, alfalfa and ryegrass (4%) than Rusti'Flore (3%).
 418 Sphingomonadales were more abundant in alfalfa and ryegrass (8%) than tall fescue and
 419 Rusti'Flore (6%) and clover (4%). Finally, Syntrophobacteriales were more abundant in
 420 alfalfa, ryegrass, tall fescue and clover (2.5%) than Rusti'Flore (1%). By contrast to the
 421 sterilized soil, introduced mycorrhizal inoculum did not influence the distribution of bacterial
 422 orders after 20 weeks of culture (Figure 1B and Table 5).

423 Taxonomic assignment of OTUs allowed us to identify at least 3 archaeal orders in the
424 sterilized soil and in the non-sterilized soil (Supplementary Table 3). The archaeal community
425 was dominated by member of the order Nitrososphaerales (more than 99%) (Supplementary
426 Table 3). In both sterilized and non-sterilized soil, no impact of vegetation, plant species and
427 mycorrhizal inoculation were observed on the relative abundances of the different archaeal
428 orders.

429 Seven and 10 dominant fungal orders were identified in sterilized and non-sterilized soils,
430 respectively (Figure 2A and 2B). A significant effect of sterilization treatments was observed
431 on the abundance of many fungal orders. The relative abundance of Microascales ($P<0.0001$),
432 Orbiliales ($P<0.0001$) and Pezizales ($P<0.0001$) were higher compared to the non-sterilized
433 soil after 20 weeks of culture. Moreover Hypocreales ($P<0.0001$), Pleosporales ($P=0.000$) and
434 Sordariales ($P=0.008$) were lower in sterilized soil compared to the non-sterilized soil (Figure
435 2A and 2B). Fungal community observed in sterilized soil was mainly composed of Orbiliales
436 (19.5%), Pezizales (18.5%), Hypocreales (15.4%), Sordariales (9.9%) and unidentified fungi
437 (33.5%) (Figure 2A). In sterilized soil, Mann-Whitney tests showed that Pleosporales
438 ($P=0.048$) were significantly increased by vegetation, especially in the presence of tall fescue
439 and Rusti'Flore (Table 6). Indeed, plant species after 20 weeks of culture, influenced
440 significantly the relative abundance of dominant orders, such as Hypocreales ($P=0.014$),
441 Orbiliales ($P=0.008$) and Xylariales ($P=0.001$). Hypocreales were more abundant in alfalfa
442 (13.6%) than with tall fescue and Rusti'Flore (6%) and clover and ryegrass (0.5%), while
443 Orbiliales were more abundant in clover and ryegrass (50%) than with alfalfa (30%), tall
444 fescue (6%) and Rusti'Flore (0.3%). Xylariales were more abundant in Rusti'Flore (6%) than
445 with clover, alfalfa, ryegrass and tall fescue (less than 0.5%).

446

447

448

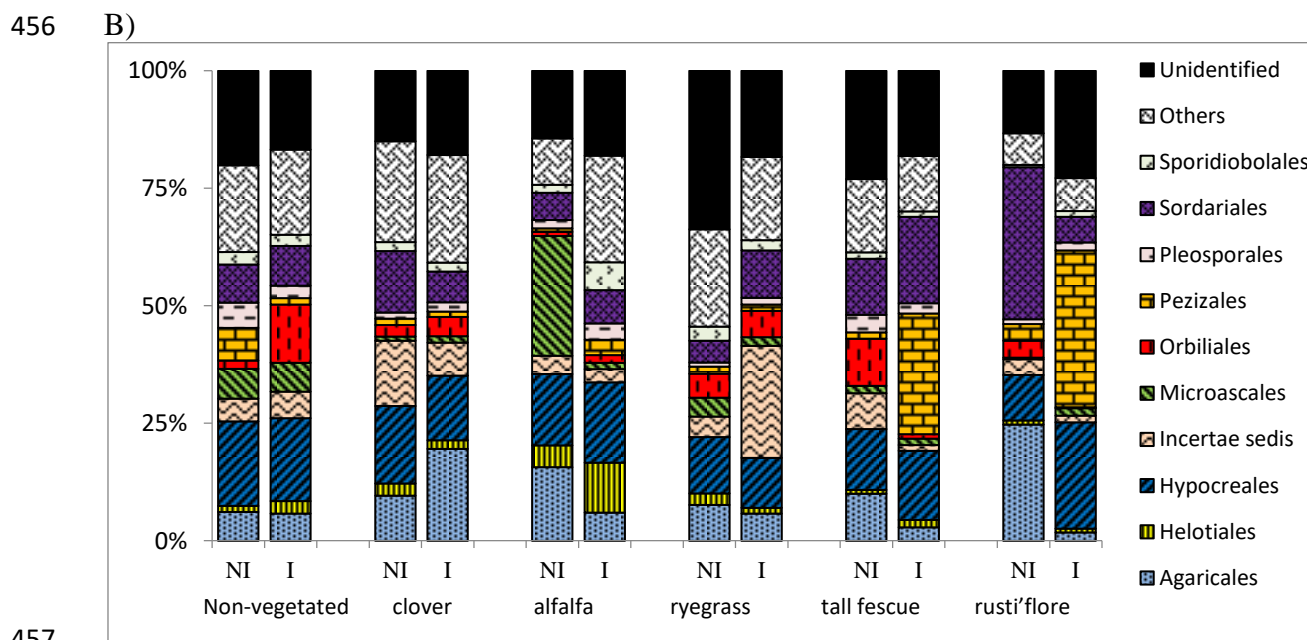
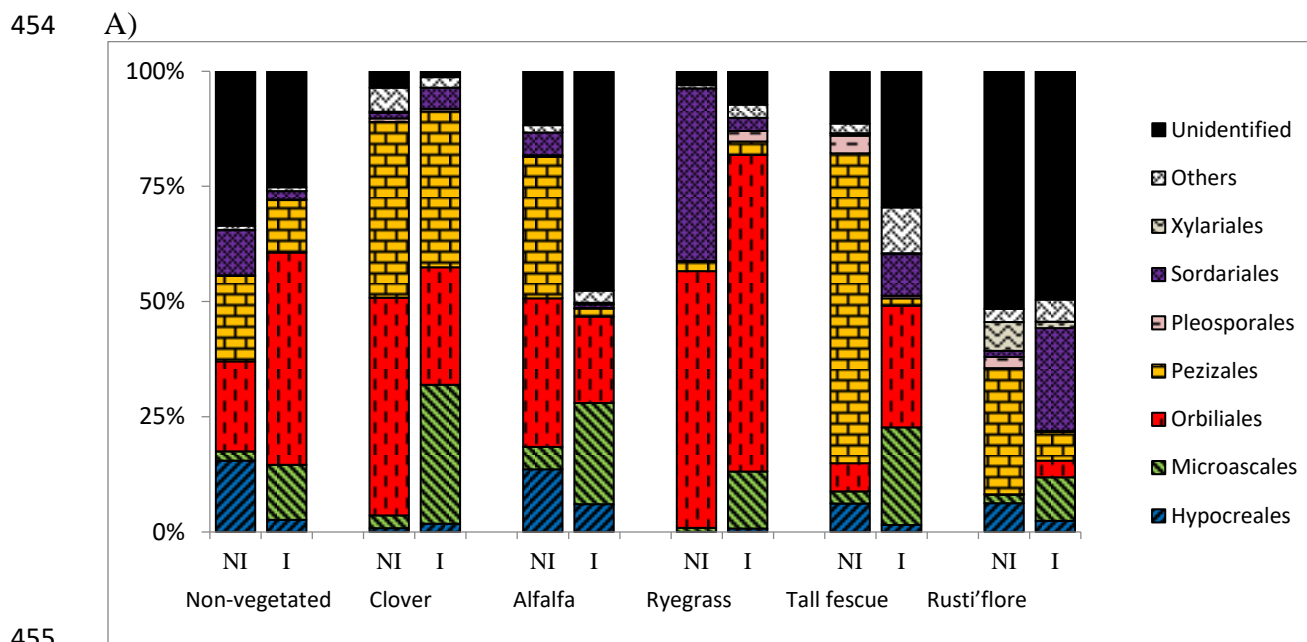
449

450

451

452

453



458 **Figure 2** Relative abundances of major fungal orders from aged polluted sterilized soil (A) and non-sterilized
 459 soil (B) cultivated with the presence of clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue and rusti'flore inoculated (I) or not
 460 (NI) by commercial AMF after 20 weeks of culture.

461 Surprisingly mycorrhizal inoculation in in sterilized and planted soil led to few changes of
 462 fungal community. The relative abundances of Orbiliales and Microascales were higher by
 463 2.4-fold, 6-fold in comparison to non-inoculated soil respectively (Figure 2A), when the
 464 relative abundance of Pezizales, Sordariales and Hypocreales decreased by 1.6, 5.3 and 6-fold
 465 in comparison to non-inoculated soil without plant species, respectively (Figure 2A). Adding
 466 Mycorrhizal inoculum to the plants modified significantly the relative abundance of
 467 Microascales ($P<0.0001$) and Pezizales ($P=0.001$). Mycorrhizal inoculation increased

468 significantly Microascales abundant in all plant species and decreased Pezizales in alfalfa, tall
 469 fescue and Rusti'Flore (Figure 2A). In non-sterilized soil (Figure 3B), the fungal community
 470 was dominated by members of the orders Hypocreales (18%), Sordariales (8%), Pezizales
 471 (7%), Agaricales (6%), Microascales (6%), Pleosporales (5.4%) and Incertae sedis (5%). In
 472 this soil, the vegetation had a significant negative impact on the relative abundance of
 473 Pleosporales ($P=0.010$). However, plant species after 20 weeks of culture, did not modified
 474 the fungal community. The addition of the mycorrhizal inoculum modulated significantly
 475 ($P=0.024$) Agaricales in vegetated soil, with a higher abundance in soil cultivated with clover,
 476 and lower abundance in soil cultivated with alfalfa, tall fescue and Rusti'Flore.

477 **Table 6:** P values for community structures of fungal, depends on vegetalization, AMF inoculation and
 478 sterilization according to Mann-Whitney, plant species according to Kruskal-Wallis. The bolded values are
 479 significant at $P<0.05$.

	Fungal	Vegetalization	Plant species	AMF inoculation	Sterilization
Sterilized soil	Xylariales	0.108	0.001	1.000	NC
	Sordariales	0.815	0.358	0.420	0.008
	Pleosporales	0.048	0.100	0.912	0.000
	Pezizales	0.656	0.115	0.001	<0.0001
	Orbiliales	0.596	0.008	0.064	<0.0001
	Microascales	0.656	0.654	<0.0001	<0.0001
	Hypocreales	0.687	0.014	0.133	<0.0001
Non-sterilized soil	Sporidiobolales	0.226	0.053	0.261	NC
	Sordariales	0.849	0.512	0.384	0.008
	Pleosporales	0.010	0.139	0.477	0.000
	Pezizales	0.567	0.167	0.235	<0.0001
	Orbiliales	0.261	0.103	0.912	<0.0001
	Microascales	0.059	0.582	0.235	<0.0001
	Incertae sedis	0.408	0.056	0.261	NC
	Hypocreales	0.094	0.598	0.962	<0.0001
	Helotiales	0.596	0.088	0.987	NC
Agaricales	0.484	0.611	0.024	NC	

480

481 PCDD/F dissipation

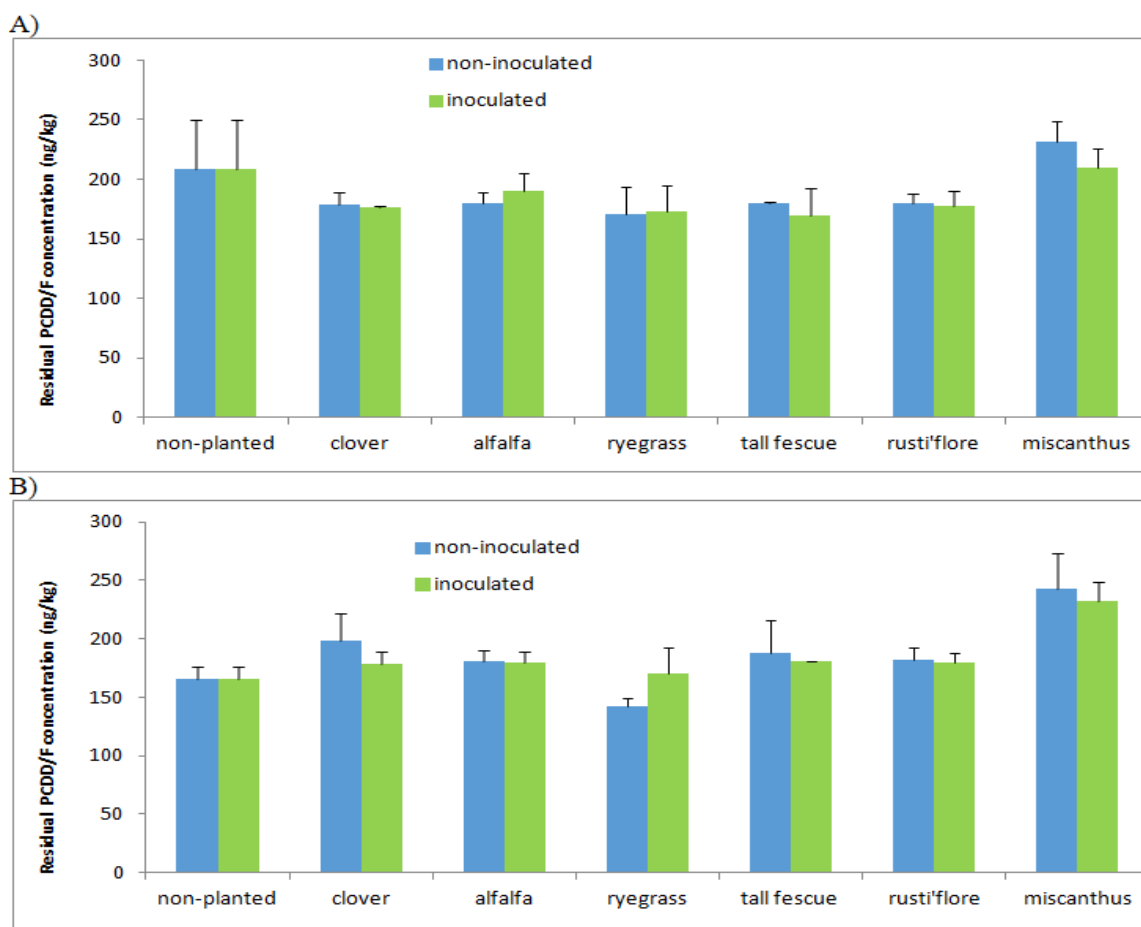
482 Residual concentrations of 17 PCDD/F congeners in the sterilized and non-sterilized polluted
 483 soils after 20 weeks of culture are presented in Figure 3. The total PCDD/F residual
 484 concentrations estimated in soils were about 208 ng/kg and 165 ng/kg in non-planted
 485 sterilized and non-sterilized soils respectively. No significant difference was observed in
 486 residual PCDD/F levels in non-planted soil before and after phytoremediation. In the
 487 sterilized soil, a downward trend in residual PCDD/F concentrations was observed in planted
 488 soils with clover, alfalfa, ryegrass and Rusti'Flore with a significant decrease (20%) in the
 489 inoculated tall fescue ($P=0.013$) (Figure 3A). No effect of AMF inoculation on total PCDD/F

490 residual concentrations was observed (Table 7). In non-sterilized soil, no dissipation was
 491 observed after 20 weeks of culture whatever the plant species and the addition or not of
 492 mycorrhizal inoculum (Figure 3B). The sterilization treatment appeared to impact the residual
 493 concentrations of 17 PCDD/F congeners, the concentrations were lower in non-sterilized soil
 494 compared to sterilized soil especially in 20 weeks-old alfalfa ($P=0.019$), ryegrass ($P=0.030$)
 495 and Rusti’Flore ($P=0.007$) (Table 7).

496 **Table 7:** P values for total PCDD/F residual concentrations on sterilized and non sterilized soil depends on AMF
 497 inoculation, Vegetation and sterilization, according to Mann-Whitney test. The bolded values are significant at
 498 $P<0.05$.

PCDD/F		non-vegetated	clover	alfalfa	ryegrass	tall fescue	Rusti’Flore	miscanthus
Sterilized soil	AMF inoculation	1.000	1.000	0.663	1.000	0.663	1.000	0.383
	Vegetation	NC	0.230	0.230	0.128	0.013	0.128	0.378
Non-sterilized soil	AMF inoculation	1.000	0.100	1.000	0.100	0.663	0.383	0.100
	Vegetation	NC	0.066	0.066	0.810	0.054	0.128	0.002
Sterilization		0.051	0.078	0.019	0.030	0.089	0.007	0.100

499



500
 501 **Figure 3** Residual concentrations of PCDD/F after 20 weeks of culture in AMF non-inoculated or AMF
 502 inoculated clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue, rusti’flore and miscanthus in microcosms containing sterilized
 503 (A) and non-sterilized aged polluted soils (B).

504

505 In order to determine to what extent the following parameters (clover, alfalfa ryegrass, tall
506 fescue, Rusti'Flore non vegetated soil, TEQ, dioxins, inoculation and sterilization) affected
507 the microbial community compositions, both bacterial and fungal communities were analyzed
508 by redundancy analysis (RDA). According to RDA, the first two canonical axes for bacterial
509 explained 29.3% and 13.4% of the variation in the species dataset, respectively
510 (Supplementary Table 4). For fungal species dataset, 19.7% and 5.5% of the variation were
511 explained by the first two canonical axes. Approximate 1/2 and 1/4 of the variation in the
512 bacterial and in fungal species dataset (42.7% and 25.2%) were explained by all four
513 significant canonical axes (Supplementary Table 4). The proportion rose to 54.6% and 30.1%
514 of the variation in the species dataset were explained by all canonical axes, respectively
515 (Supplementary Table 4). In addition, redundancy analysis (RDA) indicated that the relative
516 abundance of some microbial orders, such as Bacillales ($P=0.005$), Burkholderiales
517 ($P=0.001$), Caulobacteriales ($P=0.001$), Elin 323 ($P=0.001$), Rhizobiales ($P=0.001$),
518 Rhodospirillales ($P=0.000$) and Sphingomonadales ($P=0.014$) were correlated negatively with
519 TEQ PCDD/F concentration (Figure 4A). Additionally, Hypocreales ($P=0.044$) and
520 Polyporales ($P=0.044$) were positively correlated with TEQ PCDD/F concentration. However
521 Pezizales ($P=0.050$) was negatively correlated with TEQ PCDD/F concentration (Figure 4B).

522

523

524

525

526

527

528

529

530

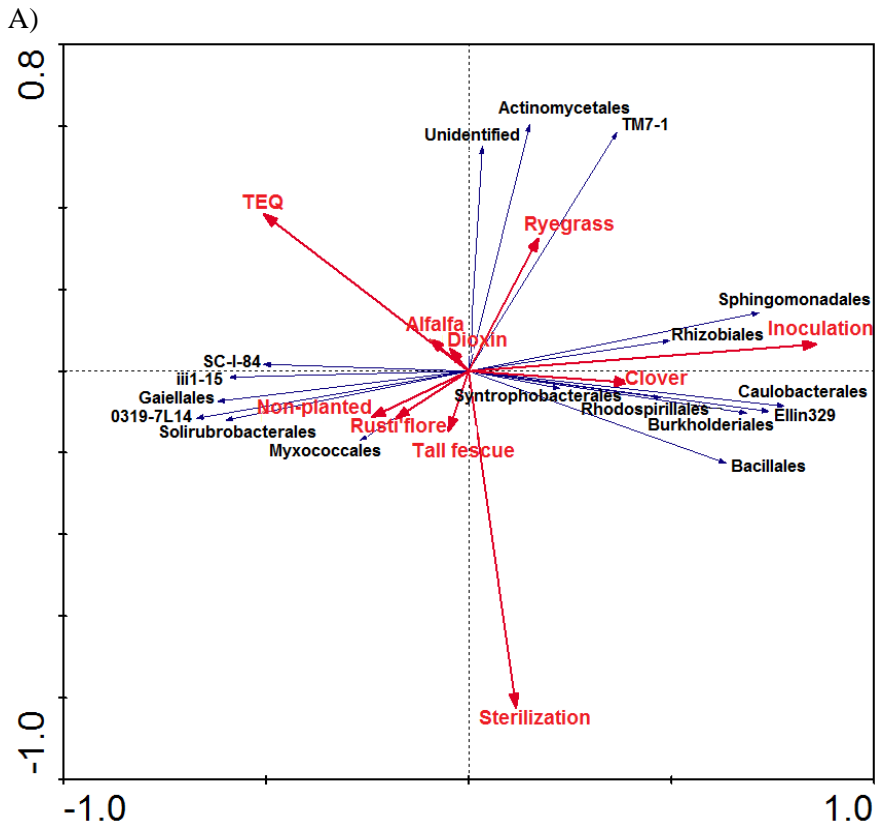
531

532

533

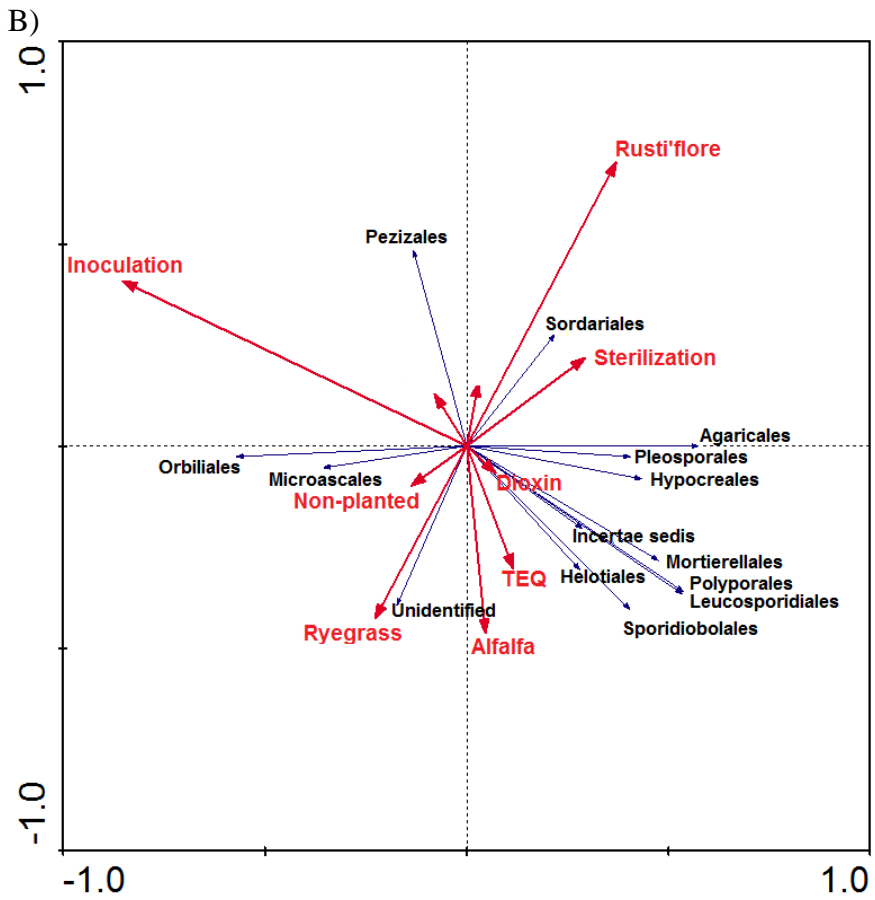
534

535



536

537



538

539 **Figure 4:** Redundancy analysis (RDA) of the rhizosphere bacterial (A) and fungal communities (B) in relation to
540 mycorrhizal inoculation, vegetation, plant species, sterilization and pollution.

541 **DISCUSSION**

542 In the present study, the structure and diversity of soil microbial communities (Bacteria,
543 Archaea and Fungi) which could play an important role in the bioremediation of aged-PCDD/F
544 contaminated soil, were analyzed in sterilized or non-sterilized soil. These soils were
545 amended or not with mycorrhizal inoculum and cultivated with different plant species (clover,
546 alfalfa, ryegrass, fescue, miscanthus and a mixture of plants), whose phytoremediation
547 abilities have been proven in many studies (Joner et Leyval, 2003; Teng et al., 2010; Técher
548 et al., 2012; Li et al., 2013; Nsanganwimana et al., 2014; Oh et al., 2014).

549 The suppression of microbial communities from the soil using δ irradiation treatment of the
550 soil, prevented the root colonization of the plants by indigenous AMF and constituted an
551 interesting matrix to test modulation of microbial community in our contaminated soil in
552 response to plants associated or not with AMF inoculum. In the case of the non-sterilized soil,
553 a spontaneous colonization by indigenous AMF was observed. Indeed, four different AMF
554 species were isolated from the aged-PCDD/F contaminated soil and identified, based on
555 morphological characters, as *Funneliformis mosseae*, *Glomus constrictum*, *Glomus*
556 *lamellosum* and *Glomus geosporum* (data not shown). All of the tested plant species were able
557 to grow on the PCDD/F-aged contaminated soil and were colonized by indigenous AMF
558 propagules or commercial mycorrhizal inoculum. The root mycorrhizal rates obtained, for
559 example for alfalfa and ryegrass, were similar or slightly higher than those observed in other
560 soils contaminated with persistent pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (Joner
561 and Leyval, 2003; Gao et al., 2011). Moreover, the colonization rates were lower in
562 inoculated plants cultivated in sterilized soil than in non-sterilized soil for all the plant species
563 tested. This result confirmed that the indigenous AMF species are often considered more
564 efficient than introduced inoculants in phytoremediation context (Lambert et al., 1980;
565 Henkel et al., 1989; Calvente et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Querejeta et al., 2006) and
566 suggested the worse adaptation of the commercial inoculum to local edaphic conditions such
567 as soil nutrient concentrations and may be the presence of the PCDD/F pollution. Moreover,
568 the addition of commercial inoculum in the non-sterilized soil (which contained indigenous
569 AMF propagules) did not led to a significant increase in plant colonization rate except for
570 clover. Two possible factors could explain the response of plant colonization rate: indigenous
571 AMF would be more effective colonizers than introduced inoculants in the polluted soil; or
572 the maximum colonization level may be already reached in regard to the edaphic conditions
573 and cannot be exceeded with further addition of commercial mycorrhizal inoculum. In both
574 sterilized and non-sterilized soils, plant species was the important factor that affected
575 mycorrhizal colonization rates, however, introduced commercial inoculant didn't had any

576 impact. This result is not surprising and it is in line with several previous studies which
577 reported that the mycorrhizal rate depended strongly on the plant species (Joner et al., 2001;
578 Gao et al., 2011). A growth improvement was observed in plants (associated or not with
579 AMF) cultivated in sterilized soil compared to non-sterilized soil. This plant growth
580 promotion could be explained by a release of some nutrients can be observed after soil
581 sterilization, for example Mahmood and colleagues (2014) correlated the increase of wheat
582 biomass with the release of soluble carbon and Mn. In our study, higher contents of Mn, Fe
583 and Al were clearly detected in sterilized soil compared to non-sterilized soil. Moreover, the
584 positive effect of sterilization on plant growth may be also explained by eradication of soil-
585 borne pathogens (Bainard et al., 2013) and/or the increased abundance of soil microbes with
586 high potential of plant growth promotion such as Bacilli which are known as biocontrol
587 agents (Shang et al., 2016). Bacilli were highly abundant in our sterilized soil compared to
588 non-sterilized soil. Introduced mycorrhizal inoculant increased aerial biomass in clover and
589 alfalfa cultivated in sterilized soil and in alfalfa grown in non-sterilized soil. This result
590 confirmed the well-known beneficial effect of mycorrhizal inoculation on plant growth (Joner
591 et al., 2001; Köhl et al., 2016). Mycorrhization provides many benefits to the host plant,
592 particularly when the association is established in the early stage of cultivation, by improving
593 its water and mineral nutrition and its tolerance to biotic and abiotic stresses (Clark and Zeto,
594 2000, Turnau and Haselwandter, 2002, Smith and Read, 2008). Although, we cannot exclude
595 that the growth promotion of some plant species observed after introduction of mycorrhizal
596 inoculum, could be the result of modifications in microbiome rhizosphere structure. Indeed, it
597 is accepted that soil microbial community structure could be influenced by vegetation, plant
598 mycorrhization and contamination (Bourdel et al., 2016; Rodríguez-Caballero et al. (2017)).
599 Our results showed that the vegetation with clover, alfalfa and ryegrass increased the number
600 of bacterial OTUs both in sterilized and non-sterilized soils. However, no significant effect
601 was observed on number of fungal and archaeal OTUs. Moreover, the vegetation has no effect
602 on microbial diversity (except a decrease of fungal diversity with Rusti'Flore) while the
603 bacterial richness increased in the presence of alfalfa, clover and Rusti'Flore in sterilized soil
604 and of alfalfa, clover and ryegrass in non-sterilized soil. Several authors have shown that the
605 vegetation increased bacterial and fungal diversity and abundance (Arroyo et al., 2013;
606 Bourceret et al., 2016). The role of root exudates in regulating soil microbial community
607 composition and diversity, has been well documented (Berg and Smalla, 2009). The suite of
608 molecules exuded by roots shape the rhizosphere environment and consequently also helps
609 shape the composition of microbial communities (Broeckling et al., 2008). In sterilized soil,
610 plant species have a significant effect on the relative abundance of dominant bacterial

611 (Sphingomonadales, Rhodospirillales and Ellin 329) and fungal orders (Hypocreales,
612 Orbiliales, and Xylariales). In non-sterilized soil, whereas plant species have also a significant
613 effect on the relative abundance of bacterial orders, such as Actinomycetales, Bacillales,
614 Gaiellales, Myxococcales, Rhodospirillales, Solirubrobacterales, Sphingomonadales, and
615 Syntrophobacterales, no effect was observed in Fungi. Each plant species is thought to select
616 specific microbial community through exudation of root systems (Berg and Smalla, 2009;
617 Sleytr et al., 2009). The composition of root exudates varies widely among plants which
618 drives relative abundance of microbes in the vicinity of the root (Binet et al., 2001). Plants not
619 only provide nutrients for microorganisms, but some plant species also contain antimicrobial
620 metabolites in their exudates that influence the structure and function of microbial
621 communities (Berg and Smalla, 2009). In addition to increasing the nutrient absorptive
622 surface area of host plant root systems, the extraradical mycelium of AMF also provides a
623 direct pathway for translocation of photosynthetically derived carbon to microenvironments in
624 the soil, thus AMF influenced the development of microbial communities (Solís-Domínguez
625 et al., 2011). Our findings showed that whereas the addition of the mycorrhizal inoculum
626 affected bacterial and fungal community structures both in sterilized and non-sterilized soils,
627 no effect was observed on archaeal community. It's also important to note that the impact of
628 introduced AMF inoculum on microbial communities was dependent of the soil treatment
629 (sterilized or non-sterilized) and on plant species. In sterilized soil, mycorrhizal inoculation
630 increased fungal OTUs in the presence of tall fescue and enhanced bacterial and fungal
631 richness in alfalfa and ryegrass respectively as well as fungal diversity in clover and
632 Rusti'Flore. By contrast, in non-sterilized soil, mycorrhizal inoculation decreased fungal
633 OTUs in the presence of clover and it increased fungal richness in the presence of tall fescue.
634 In sterilized soil, mycorrhizal inoculation positively impacted the development of fungal
635 species belonging to Microascales and Pezizales, and bacterial species belonging to
636 Actinomycetales and TM7-1 and Sphingomonadales, Bacillales and Burkholderiales. This
637 result is in accordance with different studies which showed that Bacillales were usually
638 associated with the presence of AMF (Bonfante and Anca, 2009). Qin et al. (2016) found that
639 members of Burkholderiales were stimulated by the presence of AMF in PCB contaminated
640 soil.

641 In the present work, gamma irradiation was used to eradicate soil microbiota. The biotic
642 capacity of the soil can then be restored by microorganism re-colonization. As expected,
643 OTUs number, richness and diversity were higher in non-sterilized soil compared to sterilized
644 soil for all the microbial taxa (bacteria, archaea and fungi). Soil sterilization is known to
645 increase nutrient availability and to alter community structure of the newly developed

646 microbial population (Buchan et al., 2012). Typically, a sub-sterilizing dose of γ -irradiation of
647 10 kGy eliminates Fungi, actinomycetes and invertebrates while bacteria are mostly
648 eliminated by 20 kGy (Niedr e et al., 2012) but certain radioresistant bacteria can survive to
649 dose higher than 50 kGy (McNamara et al., 2003). Surviving bacteria can thrive due to
650 greater substrate availability and less competition for the substrates. A minimum value of 50
651 kGy was used in this study and our findings revealed also an increase of the abundance of
652 some bacterial (Bacillales, Sphingomonadales and TM7-1-affiliated sequences), and fungal
653 communities (Microascales, Orbiliales and Pezizales) in sterilized soil compared to the non-
654 sterilized soil. Conversely, some other bacterial (Gaiellales, iii1-15, Myxococcales and
655 Solirubrobacterales) and fungal community abundances (Hypocreales, Pleosporales and
656 Pleosporales) were lower in sterilized soil compared to the non-sterilized soil. Many members
657 of the orders Bacillales can sporulate, generating dormant and resistant spores that can survive
658 under harsh conditions (Paredes-Sabja et al., 2011). Nevertheless, no impact of sterilization
659 was observed on archaeal abundance. This result indicates that the sterilized soil was
660 recolonized by both bacterial and fungal communities. In parallel to the microbiome
661 modulation, our study pointed out a downward trend of PCDD/F concentrations exclusively
662 in sterilized soils vegetated with clover, alfalfa, ryegrass and Rusti'Flore with a significant
663 decrease (20%) for tall fescue after 20 week-culture. To our knowledge, no studies reported
664 the efficiency of plant species in dissipation of halogenated compounds like PCDD/F from
665 aged-polluted soils. Only, Wang et al., (2009) showed that white clover reduced significantly
666 dibenzofuran (DBF) in spiking soil after 8 weeks of incubation and induced the increase of
667 DBF-degrading bacterial numbers. The bioremediation of PCDD/F requires diverse microbial
668 degradation processes together with the activity of specialized microbial communities (Chen
669 et al., 2016). Thus, our findings suggested that the aged contaminated soil contains microbial
670 and genetic resources associated with the degradation of PCDD/Fs. The microbial degradation
671 of PCDD/Fs can be initiated by the dioxygenation of an aromatic ring or reductive
672 dechlorination depending on the redox level of the surrounding environment and microbial
673 populations involved (Chen et al., 2014). According to redundancy analysis (RDA) some
674 microbial orders, such as Bacillales, Burkholderiales, Caulobacteriales, Elin 323, Rhizobiales,
675 Rhodospirillales and Sphingomonadales for bacterial community and Pezizales for fungal
676 community were correlated negatively with TEQ PCDD/F concentration. These bacterial and
677 fungal orders are probably involved in the TEQ PCDD/F concentration decrease. After
678 sterilization, the microbial colonization of soil can occur through several mechanisms: i.e.,
679 bacterial growth and/or motility and/or transport of bacteria (Jenneman et al., 1985; Huysman
680 and Verstraete, 1993). Francioli et al. (2016) suggested that changes in environmental

681 conditions brought by soil sterilization and incubation resulted in an increase in the bacterial
682 abundance that were low abundant and undetected in the original soils. In the sterilized soil
683 the reduction of PCDD/F concentration could be explained in particular by the dominance of
684 Sphingomonadales, Burkholderiales, and Bacillales orders compared to non-sterilized soil.
685 These bacterial orders have been associated with the degraders of PCDD/Fs (Nam et al.,
686 2006; Marco-Urrea et al., 2015). The soil sterilization as well as its revegetation allowed to
687 increase the contaminant-degradation potential of the soil microbial community.

688

689 **CONCLUSION**

690 Our study demonstrated that the diversity of soil bacterial, archeal and fungal communities
691 characterized by Illumina MiSeq NGS sequencing technology was impacted by (1)
692 Sterilization, with higher The abundance of some bacterial (such as Bacillales,
693 Sphingomonadales and TM7-1-affiliated sequences), and fungal communities (Microascales,
694 Orbiliales and Pezizales) in sterilized soil compared to the non-sterilized soil. This result
695 suggests that the biotic capacity of the soil can then be restored by microorganism re-
696 colonization. (2) Plant species with a higher number of bacterial OTUs in the presence of
697 clover, alfalfa and ryegrass in sterilized and non-sterilized soils. In addition plant species have
698 a significant effect on the relative abundance of dominant bacterial (Sphingomonadales,
699 Rhodospirillales and Ellin 329) and fungal orders (Hypocreales, Orbiliales, and Xylariales) in
700 non-sterilized soil and a significant effect on the relative abundance of bacterial orders, such
701 as Actinomycetales, Bacillales, Gaiellales, Myxococcales, Rhodospirillales,
702 Solirubrobacterales, Sphingomonadales, and Syntrophobacterales in non-sterilized soil. (3)
703 Mycorrhizal inoculation, It's also important to note that the impact of introduced AMF
704 inoculum on microbial communities was dependent of the soil treatment (sterilized or non-
705 sterilized) and on plant species. In sterilized soil, mycorrhizal inoculation increased fungal
706 OTUs in the presence of tall fescue and enhanced bacterial and fungal richness in alfalfa and
707 ryegrass respectively as well as fungal diversity in clover and Rusti'Flore. By contrast, in
708 non-sterilized soil, mycorrhizal inoculation decreased fungal OTUs in the presence of clover
709 and it increased fungal richness in the presence of tall fescue. In sterilized soil, mycorrhizal
710 inoculation positively impacted the development of fungal species belonging to Microascales
711 and Pezizales, and bacterial species belonging to Actinomycetales and TM7-1 and
712 Sphingomonadales, Bacillales and Burkholdriales.

713 **Funding**

714 *This work was supported by FEDER, and ADEME.*

715

716 **Acknowledgments**

717 *Experiments presented in this paper were carried out using the CALCULCO computing*
718 *platform, supported by SCoSI/ULCO (Service COmmun du Système d'Information de*
719 *l'Université du Littoral Côte d'Opale).*

720

721 **Reference**

722 ATSDR, 1998 Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1998.
723 Toxicological profile for chlorinated dibenzo-*p*-dioxins (CDDs). Department of Health
724 and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, December 1998.

725 Arroyo, P., Ansola, G., and Miera, L. E. S. de (2013). Effects of substrate, vegetation and
726 flow on arsenic and zinc removal efficiency and microbial diversity in constructed
727 wetlands. *Ecol. Eng.* 51, 95–103. doi:10.1016/j.ecoleng.2012.12.013.

728 Bainard, L. D., Koch, A. M., Gordon, A. M., and Klironomos, J. N. (2013). Growth response
729 of crops to soil microbial communities from conventional monocropping and tree-based
730 intercropping systems. *Plant Soil* 363, 345–356. doi:10.1007/s11104-012-1321-5.

731 Bakker, M.G., Manter, D.K., Sheflin, A.M., Weir, T.L., Vivanco, J.M. (2012). Harnessing the
732 rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. *Plant Soil*
733 360, 1–13.

734 Berg, G., and Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure
735 and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 1–
736 13. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x.

737 Binet, P., Portal, J. M., and Leyval, C. (2000). Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons
738 (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant Soil* 227, 207–213.
739 doi:10.1023/A:1026587418611.

740 Binet, P., Portal, J.M., Leyval, C. (2001). Application of GC-MS to the study of anthracene
741 disappearance in the rhizosphere of ryegrass. *Organic Geochemistry* 32: 217-222.

742

743 Bonfante, P., Anca, I. (2009). Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: A network of
744 interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 63,363-383.

745 Bourdel, G., Roy-Bolduc, A., St-Arnaud, M., and Hijri, M. (2016). Concentration of
746 petroleum-hydrocarbon contamination shapes fungal endophytic community structure in
747 plant roots. *Front. Microbiol.* 7, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2016.00685.

748 Broeckling, C. D., Broz, A. K., Bergelson, J., Manter, D. K., and Vivanco, J. M. (2008). Root
749 exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Appl. Environ.*
750 *Microbiol.* 74, 738–744. doi:10.1128/AEM.02188-07.

751 Buchan, D., Moeskops, B., Ameloot, N., De Neve, S., and Sleutel, S. (2012). Selective
752 sterilisation of undisturbed soil cores by gamma irradiation: Effects on free-living
753 nematodes, microbial community and nitrogen dynamics. *Soil Biol. Biochem.* 47, 10–13.

- 754 doi:10.1016/j.soilbio.2011.12.014.
- 755 Cadillo-Quiroz, H., Yavitt, J. B., Zinder, S. H., Thies, J. E. (2010). Diversity and community
756 structure of Archaea inhabiting the rhizoplane of two contrasting plants from an acidic
757 bog. *Microbial ecology*. 59 (4), 757-767.
- 758 Calvente, R., Cano, C., Ferrol, N., Azcon-Aguilar, C. and Barea, J. M. (2004). Analysing
759 natural diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in olive tree (*Olea europaea* L.)
760 plantations and assessment of the effectiveness of native fungal isolates as inoculants for
761 commercial cultivars of olive plants. *Appl. Soil Ecol.* 26: 11-19.
- 762 Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., et al 2010. QIIME allows analysis of
763 highthroughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335–336.
764 doi:10.1038/nmeth.f.303
- 765 Chaparro, J.M., Badri, D.V., Bakker, M.G., Sugiyama, A., Manter, D.K., Vivanco, J.M.
766 (2013) Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that
767 are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS ONE*
768 8: e55731
- 769 Chen, W.-Y., Wu, J.H., and Chang, J.-E. (2014). Pyrosequencing analysis reveals high
770 population dynamics of the soil microcosm degrading octachlorodibenzofuran. *Microbes*
771 *Environ.* 29, 393–400. doi:10.1264/jsme2.ME14001.
- 772 Chen, W., Wu, J., Lin, S., and Chang, J. (2016). Bioremediation of polychlorinated- p -
773 dioxins / dibenzofurans contaminated soil using simulated compost-amended landfill
774 reactors under hypoxic conditions. *J. Hazard. Mater.* 312, 159–168.
775 doi:10.1016/j.jhazmat.2016.03.060.
- 776 Clark, R.B., Zeto S.K. (2000). Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants *J. Plant*
777 *Nutr.*, 23, pp. 867–902
- 778 Cook, R. L., and Hesterberg, D. (2013). Comparison of trees and grasses for rhizoremediation
779 of petroleum hydrocarbons. *Int. J. Phytoremediation* 15, 844–860.
780 doi:10.1080/15226514.2012.760518.
- 781 Cunningham, S. D., Berti, W. R., and Huang, J. W. (1995). Phytoremediation of contaminated
782 soils. *Trends Biotechnol.* 13, 393–397. doi:10.1016/S0167-7799(00)88987-8.
- 783 Davidson, B. E., Novak, S. J., and Serpe, M. D. (2016). Consequences of inoculation with
784 native arbuscular mycorrhizal fungi for root colonization and survival of *Artemisia*
785 *tridentata* ssp. *wyomingensis* seedlings after transplanting. *Mycorrhiza* 26, 595–608.
786 doi:10.1007/s00572-016-0696-1.
- 787 Feng, N.X., Yu, J, Zhao, H.M., Cheng, Y.T., Mo CH, Cai QY, Li YW, Li H, Wong MH.
788 (2017). Efficient phytoremediation of organic contaminants in soils using plant–
789 endophyte partnerships. *Science of the Total Environment* 583, 352–368.
- 790 Fester, T., Giebler, J., Wick, L.Y., Schlosser, D., Kästner, M. (2014). Plant–microbe
791 interactions as drivers of ecosystem functions relevant for the biodegradation of organic
792 contaminants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 168–175.

- 793 Francioli, D., Schulz, E., Lentendu, G., Wubet, T., Buscot, F., and Reitz, T. (2016). Mineral
 794 vs. organic amendments: microbial community structure, activity and abundance of
 795 agriculturally relevant microbes are driven by long-term fertilization strategies. *Front.*
 796 *Microbiol.* 7, 14-46. doi: 10.3389/fmicb.2016.01446
- 797 Gao, Y., Li, Q., Ling, W., and Zhu, X. (2011). Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of
 798 soils contaminated with phenanthrene and pyrene. *J. Hazard. Mater.* 185, 703–709.
 799 doi:10.1016/j.jhazmat.2010.09.076.
- 800 Hanano, A., Almously, I., and Shaban, M. (2014). Phytotoxicity effects and biological
 801 responses of *Arabidopsis thaliana* to 2,3,7,8-tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin exposure.
 802 *Chemosphere* 104, 76–84. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.10.060.
- 803 Hassan, S. E. D., Bell, T. H., Stefani, F. O. P., Denis, D., Hijri, M., and St-Arnaud, M. (2014).
 804 Contrasting the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi from hydrocarbon-
 805 contaminated and uncontaminated soils following willow (*Salix* spp. L.) planting. *PLoS*
 806 *One* 9, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0102838.
- 807 Henkel, T. W., Smith, W. K. and Christensen, M. (1989). Infectivity and effectivity of
 808 indigenous vesiculararbuscular mycorrhizal fungi from contiguous soils in southwestern
 809 Wyoming, USA. *New Phytol.* 112: 205-214.
- 810 Huang, X.F., Chaparro, J.M., Reardon, K.F., Zhang, R., Shen, Q., Vivanco, J.M. (2014)
 811 Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*
 812 92: 267–275.
- 813 Huysman, F., Verstraete, W. (1993). Effect of cell surface characteristics on the adhesion of
 814 bacteria to soil particles. *Biol Fertil Soils.* 16, 21–26.
- 815 Inui, H., Wakai, T., Gion, K., Kim, Y.S., Eun, H. (2008). Differential uptake for dioxin-like
 816 compounds by zucchini subspecies. *Chemosphere* 73:1602–1607.
- 817 Jenneman, G.E., McInerney, M.J., Knapp, R.M. (1985). Microbial penetration through
 818 nutrient-saturated Berea sandstone. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:383-391.
- 819 Joner, E. J., and Leyval, C. (2001). Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass
 820 grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza* 10,
 821 155–159. doi:10.1007/s005720000071.
- 822 Joner, E.J., Leyval, C. (2003). Rhizosphere Gradients of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (
 823 PAH) Dissipation in Two Industrial Soils and the Impact of Arbuscular Mycorrhiza.
 824 *Environmental Science & Technology* 37: 2371–2375.
- 825 Jones, D. L., Jones, D. L., Hodge, A., and Kuzyakov, Y. (2004). Plant and mycorrhizal
 826 regulation of rhizodeposition. 459–480.
- 827 Köhl, L., Lukasiewicz C.E., van der Heijden, M.G.A. (2016). Establishment and effectiveness
 828 of inoculated arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Plant, Cell &*
 829 *Environment* 39, 136–146
- 830 Lambert, D. H., Cole, Jr. H. and Baker, D. E. 1980. Adaptation of vesiculararbuscular

- 831 mycorrhizae to edaphic factors. *New Phytol.* 85: 513520.
- 832 Lenoir, I., Fontaine, J., and Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal
833 responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry* 123, 4–15.
834 doi:10.1016/j.phytochem.2016.01.002.
- 835 Lenoir, I., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Frédéric, L., Yolande, D., and Joël, F. (2016).
836 Arbuscular mycorrhizal wheat inoculation promotes alkane and polycyclic aromatic
837 hydrocarbon biodegradation: Microcosm experiment on aged-contaminated soil.
838 *Environ. Pollut.* 213, 549–560. doi:10.1016/j.envpol.2016.02.056.
- 839 Li, F., Fan, Z., Xiao, O., Oh, K., Ma, X., Hou, W. (2009). “Contamination, chemical
840 speciation and vertical distribution of heavy metals in soils of an old and large industrial
841 zone in Northeast China,” *Environ. Geol.* 57, 1815-1823.
- 842 Li, Y., Liang, F., Zhu, Y., and Wang, F. (2013). Phytoremediation of a PCB-contaminated
843 soil by alfalfa and tall fescue single and mixed plants cultivation. *J. Soils Sediments* 13,
844 925–931. doi:10.1007/s11368-012-0618-6.
- 845 Liu, S. L., Luo, Y. M., Cao, Z. H., Wu, L. H., Ding, K. Q., and Christie, P. (2004).
846 Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environ.*
847 *Geochem. Health* 26, 285–293. doi:10.1023/B:EGAH.0000039592.80489.e5.
- 848 Mahmood, T., Mehnaz, S., Fleischmann, F., Ali, R., Hashmi, Z. H., and Iqbal, Z. (2014). Soil
849 sterilization effects on root growth and formation of rhizosheaths in wheat seedlings.
850 *Pedobiologia (Jena)*. 57, 123–130. doi:10.1016/j.pedobi.2013.12.005.
- 851 Marco-Urrea, E., Garcia-Romera, I., Aranda, E. (2015). Potential of non-ligninolytic fungi in
852 bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. *N. Biotechnol.* 32,
853 620–628.
- 854 Marschner, P., Yang, C., Lieberei, R., Crowley, D. E. (2001). Soil and plant specific effects
855 on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*.
856 33, 1437–1445.
- 857 Marschner, P., and Timonen, S. (2006). Bacterial community composition and activity in
858 rhizosphere of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol.* 7. Available
859 at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-29420-1_8.
- 860 McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.L., Swan, J.A. (1990). A new
861 method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-
862 arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115, 495–501.
- 863 McNamara, N.P., Black, H.I.J., Beresford, N.A., Parekh, N.R. (2003). Effects of acute gamma
864 irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. *Applied Soil Ecology*
865 24, 117–132
- 866 Megharaj, M., Wittich, R.M., Blasco, R., Pieper, D.H., Timmis, K. N. (1997). Superior
867 survival and degradation of dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran in soil by soil-adapted
868 *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl Microbiol Biotechnol.* 48, 109-114.
- 869 Meng, L., Qiao, M., Peter, H.H. (2011). Phytoremediation efficiency of a PAH-contaminated

- 870 industrial soil using ryegrass, white clover, and celery as mono- and mixed cultures. *J*
 871 *Soils Sediments* 11:482–490. DOI 10.1007/s11368-010-0319-y.
- 872 Miclean, M., Levei, E., Gog, A., Ferenczi, L., Majdik, C., Puia, C., Roman, C. (2010).
 873 Determination of total petroleum hydrocarbons in contaminated soil by FTIR and GC-
 874 FID methods. *Studia UBB Chemia* 55: 88–91.
- 875 Nam, I., Kim, Y., Schmidt, S., and Chang, Y. (2006). Dioxin by *Sphingomonas wittichii*
 876 Strain RW1. *Society* 72, 112–116. doi:10.1128/AEM.72.1.112.
- 877 Niedrée, B., Vereecken, H., and Burauel, P. (2012). Effects of low-level radioactive soil
 878 contamination and sterilization on the degradation of radiolabeled wheat straw. *J.*
 879 *Environ. Radioact.* 109, 29–35. doi:10.1016/j.jenvrad.2011.12.018.
- 880 Nsanganwimana, F., Pourrut, B., Mench, M., and Douay, F. (2014). Suitability of *Miscanthus*
 881 species for managing inorganic and organic contaminated land and restoring ecosystem
 882 services. A review. *J. Environ. Manage.* 143, 123–134.
 883 doi:10.1016/j.jenvman.2014.04.027.
- 884 Nwoko, C.O. (2014). Effect of Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi on the Physiological
 885 Performance of *Phaseolus vulgaris* Grown under Crude Oil Contaminated Soil. *Journal*
 886 *of Geoscience and Environment Protection* 2: 9–14.
- 887 Oh, K., Cao, T., Li, T., and Cheng, H. (2014). Study on Application of Phytoremediation
 888 Technology in Management and Remediation of Contaminated Soils. *J. Clean Energy*
 889 *Technol.* 2, 216–220. doi:10.7763/JOCET.2014.V2.126.
- 890 Okparanma, R. (2013). Determination of total petroleum hydrocarbon (TPH) and polycyclic
 891 aromatic hydrocarbon (PAH) in soils: a review of spectroscopic and non-spectroscopic
 892 techniques. *Applied Spectroscopy Reviews* 48: 458–486.
- 893 Oliveira, R.S., Vos_atka, M., Dodd, J.C., Castro, P.M.L. (2005). Studies on the diversity of
 894 arbuscular mycorrhizal fungi and the efficacy of two native isolates in a highly alkaline
 895 anthropogenic sediment. *Mycorrhiza* 16, 23-31.
- 896 Paredes-Sabja, D., Setlow, P., Sarker, M.R. (2011). Germination of spores
 897 of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved. *Trends in*
 898 *Microbiology*. 19, 85-94. DOI:10.1016/j.tim.2010.10.004.
- 899 Querejeta, J.I., Allen, M.F., Caravaca, F., Roldán, A. (2006). Differential modulation of host
 900 plant $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ by native and nonnative arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid
 901 environment. *New Phytologist* 169: 379–387.
- 902 Qin, H., Brookes, P. C., and Xu, J. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae alter soil
 903 bacterial community and enhance polychlorinated biphenyls dissipation. *Front.*
 904 *Microbiol.* 7, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2016.00939.
- 905 Reichenauer, Th.G., Germida, J.J. (2008). Phytoremediation of Organic Contaminants in Soil
 906 and Groundwater. *ChenSusChem.* 1, 708-717. doi: 10.1002/cssc.200800125
- 907 Rodríguez-Caballero, G., Caravaca, F., Fernández-González, A. J., Alguacil, M. M.,
 908 Fernández-López, M., and Roldán, A. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation

- 909 mediated changes in rhizosphere bacterial community structure while promoting
 910 revegetation in a semiarid ecosystem. *Sci. Total Environ.* 585, 838–848.
 911 doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.128.
- 912 Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B.,
 913 Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B.,
 914 Thallinger, G.G., Horn, D.J., Van, Weber, C.F., (2009). Introducing mothur: open
 915 source, platform-independent, community-supported software for describing and
 916 comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7537-
 917 7541. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01541-09>.
- 918 Shang, Q., Yang, G., Wang, Y., Wu, X., Zhao, X., Hao, H., (2016). Illumina-based analysis of
 919 the rhizosphere microbial communities associated with healthy and wilted Lanzhou lily
 920 (*Lilium davidii* var. *unicolor*) plants grown in the field. *World J. Microbiol. Biotechnol.*
 921 32. doi:10.1007/s11274-016-2051-2.
- 922 Singh, A., Singh, R. S., Upadhyay, S. N., Joshi, C. G., Tripathi, A. K., Dubey, S. K. (2012).
 923 Community structure of methanogenic archaea and methane production associated with
 924 compost-treated tropical rice-field soil. *FEMS microbiology ecology.* 82(1), 118-134.
- 925 Sleytr, K., Tietz, A., Langergraber, G., Haberla, R., Sessitsch, A. (2009). Diversity of
 926 abundant bacteria in subsurface vertical flow constructed wetlands. *Ecol. Eng.* 35 (6),
 927 1021–1025.
- 928 Smith, S.E., Read, D.J., 2008. Mycorrhizal Symbiosis, 3rd edn. Academic, New York.
- 929 Solís-Domínguez, F. A., Valentín-Vargas, A., Chorover, J., and Maier, R. M. (2011). Effect
 930 of arbuscular mycorrhizal fungi on plant biomass and the rhizosphere microbial
 931 community structure of mesquite grown in acidic lead/zinc mine tailings. *Sci. Total*
 932 *Environ.* 409, 1009–1016. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.11.020.
- 933 Técher, D., Lava-Gilly, Ph., Henry, S., Bennisroune, A., Martinez-Chois, C., D’Innocenzo,
 934 M., Jairo, F. (2012). Prospects of *Miscanthus x giganteus* for PAH phytoremediation: A
 935 microcosm study. *Ind. Crops Prod.* 36, 276–281. doi:10.1016/j.indcrop.2011.10.030.
- 936 Teng, Y., Luo, Y., Sun, X., Tu, C., Xu, L., Liu, W., Li, Z., Christie, P. (2010). Influence of
 937 arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* on phytoremediation by alfalfa of an agricultural
 938 soil contaminated with weathered PCBs: a field study. *Int. J. Phytoremediation* 12, 516–
 939 533. doi:10.1080/15226510903353120.
- 940 Thijs, S., Sillen, W., Rineau, F., Weyens, N., Vangronsveld, J. (2016). Towards an enhanced
 941 understanding of plant–microbiome interactions to improve phytoremediation:
 942 engineering the metaorganism. *Front. Microbiol.* 7, 341.
- 943 Toljander, J. F., Lindahl, B. D., Paul, L. R., Elfstrand, M., and Finlay, R. D. (2007). Influence
 944 of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community
 945 structure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61, 295–304. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00337.x.
- 946 Turnau, K., Haselwandter, K. (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi: an essential component
 947 of soil microflora in ecosystem restoration S. Gianinazzi, H. Schuepp (Eds.),
 948 Mycorrhizal Technology: from Genes to Bioproducts, Birkhauser, Basel, pp. 137–149

Publication 1

949 Van Aken, B., Correa, P.A., and Schnoor, J.L. (2011). Phytoremediation of Polychlorinated
950 Biphenyls: New Trends and Promises. *Environ Sci Technol.* 44, 2767–2776.
951 doi:10.1021/es902514d.

952 Wang, Y., and Oyaizu, H. (2009). Evaluation of the phytoremediation potential of four plant
953 species for dibenzofuran-contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 168, 760–764.
954 doi:10.1016/j.jhazmat.2009.02.082.

955 White, P.A., Claxton, L.D. (2004). Benzo[a]pyrene, polynuclear aromatic compounds, part 1.
956 *Mutation Research* 567, 227-345.

957 Zhou, X., Zhou, J., and Xiang, X. (2013). Impact of four plant species and arbuscular
958 mycorrhizal (AM) fungi on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in
959 spiked soil. *Polish J. Environ. Stud.* 22, 1239–1245. Available at:
960 <http://www.pjoes.com/pdf/22.4/Pol.J.Environ.Stud.Vol.22.No.4.1239-1245.pdf>.

961

962

963

964

965

966

967

968

969

970

971

972

973

974

975

976

977

978

979

980

981 *Supplementary Material*

982 **Table S1** Alpha diversity metrics for rhizosphere samples collected from sterilized or on non-sterilized aged-
 983 polluted soil, non-vegetated and vegetated with different plant species (clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue and
 984 Rusti'Flore) and inoculated or not with commercial AMF.

		Observed OTUs		Chao1 richness estimate		Shannon diversity index		
		Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	
Archaea	Sterilized soil	Non-vegetated	12 ± 1	10 ± 2	12 ± 2	10 ± 2	1.4 ± 0.41	1.0 ± 0.36
		Clover	11 ± 2	7 ± 2	11 ± 2	6 ± 2	1.2 ± 0.43	0.6 ± 0.44
		Alfalfa	10 ± 1	13 ± 2	9 ± 2	12 ± 2	0.9 ± 0.48	0.9 ± 0.23
		Ryegrass	11 ± 2	10 ± 1	10 ± 1	10 ± 1	0.8 ± 0.03	1.0 ± 0.30
		Tall fescue	13 ± 1	11 ± 2	12 ± 1	11 ± 2	1.2 ± 0.16	1.0 ± 0.22
		Rusti'Flore	9 ± 1	9 ± 1	8 ± 1	8 ± 2	0.7 ± 0.47	0.7 ± 0.35
	Non-sterilized soil	Non-vegetated	26 ± 2	28 ± 3	25 ± 4	24 ± 1	2 ± 0.33	1.6 ± 0.15
		Clover	27 ± 2	27 ± 2	27 ± 6	24 ± 3	2.8 ± 0.25	2.3 ± 0.44
		Alfalfa	28 ± 1	27 ± 2	28 ± 8	24 ± 2	1.5 ± 0.21	1.7 ± 0.10
		Ryegrass	29 ± 2	28 ± 1	28 ± 5	27 ± 4	2 ± 0.37	2.4 ± 0.40
		Tall fescue	26 ± 3	23 ± 9	25 ± 1	22 ± 8	1.5 ± 0.14	1.8 ± 0.67
		Rusti'Flore	31 ± 1	30 ± 2	27 ± 2	28 ± 3	2.9 ± 0.15	2.9 ± 0.09

985
 986 **Table S2:** *P* values for community structures of archaea, depends on sterilization according to Mann-Whitney.
 987 The bolded values are significant at $P < 0.05$.

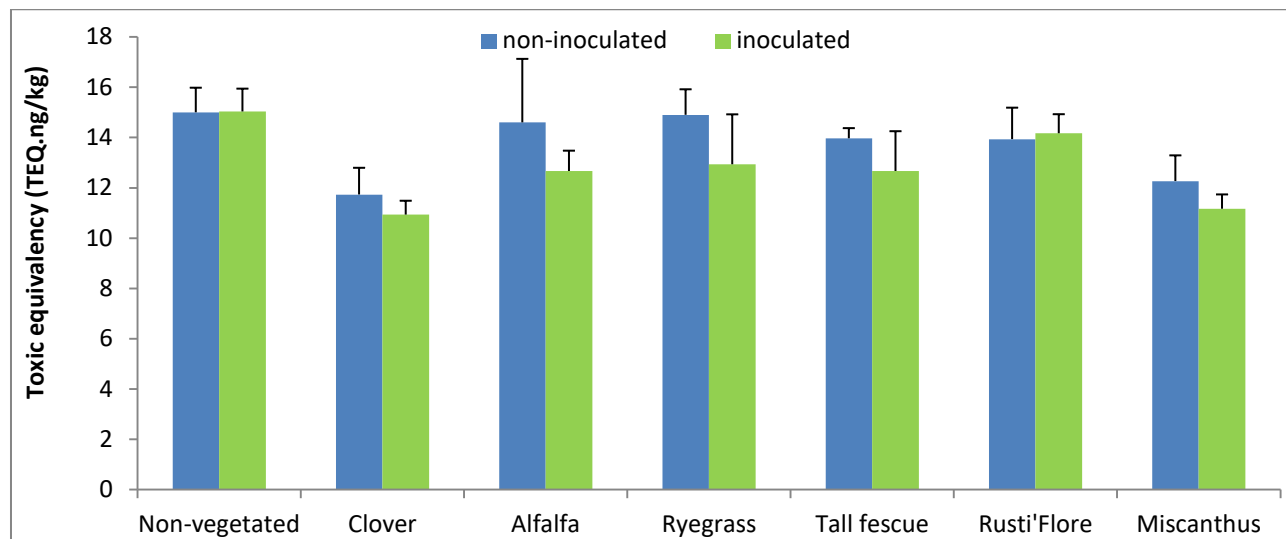
Sterilization	non-vegetated	clover	alfalfa	ryegrass	tall fescue	Rusti'Flore
Observed OTUs	0.002	0.002	0.002	0.002	0.045	0.001
Chao1 richness estimate	0.002	0.001	0.002	0.002	0.002	0.001
Shannon diversity index	0.090	0.030	0.100	0.002	0.253	0.001

988 **Table S3** Relative abundances of archaeal orders from aged polluted sterilized soil and non-sterilized soil
 989 cultivated with the presence of clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue and Rusti'Flore inoculated or not by
 990 commercial AMF after 20 weeks of culture.

		Nitrososphaerales (%)		YLA114 (%)		Methanobacteriales (%)		
		Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	
Archaea	Sterilized soil	Non-vegetated	99.79	99.97	0.01	0.01	0.20	0.02
		Clover	99.91	100	0.09	0	0	0
		Alfalfa	99.93	99.91	0.07	0.09	0	0
		Ryegrass	99.99	99.99	0.01	0.01	0	0
		Tall fescue	99.93	99.99	0.07	0.01	0	0
		Rusti'Flore	99.99	99.99	0.01	0.01	0	0
	Non-sterilized soil	Non-vegetated	99.91	99.96	0.09	0.04	0	0
		Clover	99.99	99.93	0.01	0.07	0	0
		Alfalfa	99.98	99.97	0.018	0.02	0.002	0.01
		Ryegrass	99.95	98.91	0.026	1.03	0.024	0.06
		Tall fescue	99.93	99.89	0.05	0.10	0.02	0.01
		Rusti'Flore	99.70	99.89	0.30	0.11	0	0

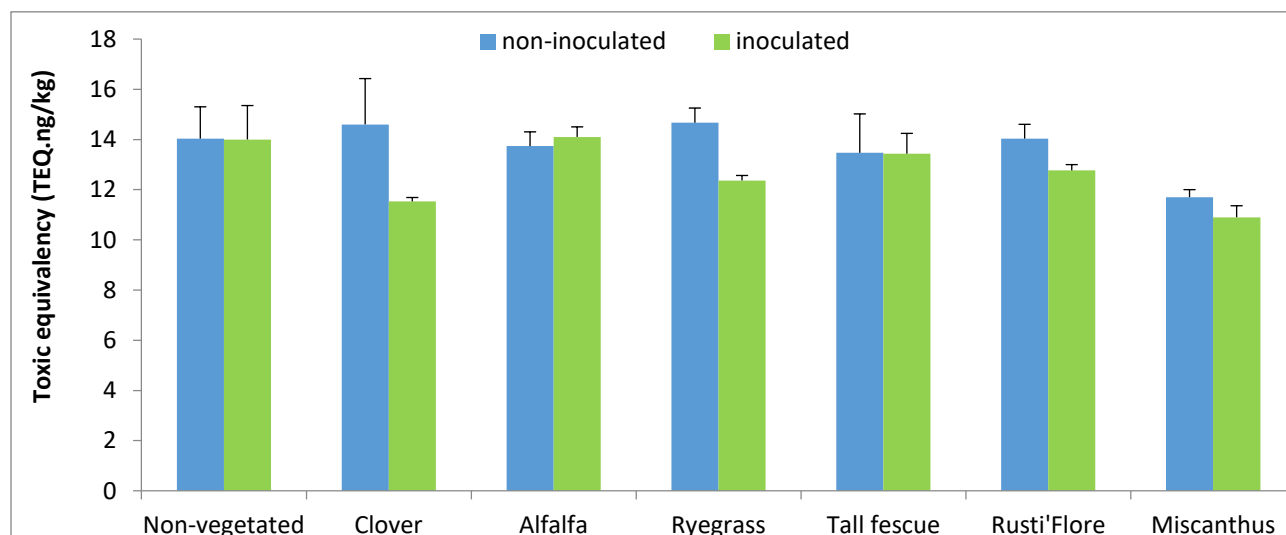
991

992 A)



993

994 B)



995

996 **Figure S1** TEQ PCDD/F concentrations after 20 weeks of culture in AMF non-inoculated or AMF inoculated
 997 clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue, Rusti'Flore and miscanthus in microcosms containing sterilized (A) and
 998 non-sterilized aged polluted soils (B).

Présentation de la publication 2

D'après les résultats obtenus dans l'étude précédente, l'inoculation mycorhizienne module les communautés microbiennes du sol pollué. Cette modulation est plus ou moins marquée en fonction de la diversité initiale du sol. Cependant, l'efficacité de la phytoremédiation assistée par les CMA dans la dissipation des PCDD/F n'a pas été clairement démontrée lors de la précédente étude (publication 1). En effet, l'apport des CMA dans la phytoremédiation des sols historiquement contaminés peut dépendre des espèces ou des souches mycorhiziennes utilisées pour inoculer les plantes (Middleton et al., 2015). Il a été démontré que les espèces de CMA isolées à partir de sols contaminés sont capables de tolérer des concentrations plus importantes de polluants que celles isolées des sols non contaminés (Weissenhorn et al., 1995). De plus, les espèces autochtones sont généralement mieux adaptées aux conditions climatiques et édaphiques locales et sont donc plus susceptibles de survivre et de se propager que les espèces exogènes (Rowe et al., 2007). Par conséquent, afin de déterminer si l'origine des souches de CMA composant l'inoculum mycorrhizien peut influencer l'efficacité de la phytoremédiation des sols contaminés par les PCDD/F, deux inocula ont été comparés. L'un est un mélange de deux inocula commerciaux FR140® (*F. mosseae*, MycAgro Ltd.) et Solrize® (*Glomus sp.*, Agrauxine Ltd.) tandis que le second est un inoculum autochtone produit dans notre laboratoire par piégeage des spores de CMA contenues dans le sol de la ferme de Noir Pot historiquement contaminé par les PCDD/F avec du poireau (*Allium porrum*) cultivé pendant 6 mois. Cet inoculum contient quatre espèces de CMA, identifiées sur la base de critères morphologiques, *Glomus constrictum*, *Glomus lamellosum*, *Glomus geosporum* et *F. mosseae*. L'inoculum commercial, quant à lui, est composé de deux espèces de CMA : *F. mosseae* et *Glomus sp.*

Le choix des espèces végétales retenues dans la conduite de l'expérience 2 a reposé principalement sur des données bibliographiques démontrant l'efficacité de la luzerne ou de la fétuque dans la dissipation de composés chlorés tels que les PCB (Chekol et al., 2004 ; Teng et al., 2010 ; Li et al., 2013). En effet, lors de l'expérimentation 1 (publication 1), aucune espèce végétale ne s'est réellement détachée des autres en termes de dissipation des PCDD/F. Ainsi, la présente étude vise à comparer l'effet de deux inocula mycorhiziens (autochtone et commercial) en association avec deux espèces végétales (luzerne et fétuque) sur (1) la croissance de la plante, (2) la composition, la diversité et la richesse des communautés microbiennes (bactéries, champignons et Archées) du sol contaminé par les PCDD/F et sur (3) la dissipation de ces polluants. Cette expérimentation a été menée en prolongeant le temps de culture jusqu'à 24 semaines (20 semaines dans l'expérimentation

1) dans des microcosmes contenant un sol stérilisé par rayons γ , ré-inoculé à l'aide d'un filtrat contenant la microflore autochtone sans les spores de CMA.

Les deux inocula (commercial et autochtone) ont permis l'obtention de taux de mycorhization satisfaisants chez les deux espèces végétales, la luzerne et la fétuque, cultivées sur le sol historiquement contaminé par les PCDD/F. En revanche, une augmentation de la croissance de la partie aérienne des deux espèces végétales a pu être observée uniquement avec l'inoculum commercial. Quelle que soit l'espèce végétale utilisée, la végétalisation du sol a conduit à une dissipation des PCCD/F (22 % pour la luzerne et 35% pour la fétuque) en 24 semaines. Par ailleurs, nos résultats ont montré que la végétalisation affecte le nombre d'OTUs et la richesse microbienne du sol contaminé (bactéries, champignons et les Archées) et stimule spécifiquement certaines communautés microbiennes susceptibles d'être impliquées dans la dissipation des PCCD/F: Planctomycétia, Solibactères et Pezizomycètes. Une augmentation de l'activité microbienne du sol, mesurée par la fluorescéine di-acétate hydrolase et la déshydrogénase dans le sol, pourrait être à l'origine de cette diminution des concentrations en PCCD/F. En revanche, malgré une augmentation du nombre d'OTUs bactériens (en particulier avec l'inoculum autochtone) et de la richesse microbienne, l'inoculation mycorhizienne de la luzerne et la fétuque n'améliorent pas la dissipation des PCCD/F dans le sol et ce quelle que soit l'origine de l'inoculum, qu'il soit autochtone ou commercial.

1 **Arbuscular mycorrhizal inoculum origin influences microbial community structure of**
2 **aged dioxin/furan-contaminated soil but not the pollutant dissipation rate**

H Megloul¹. A Lounès-Hadj Sahraoui¹. M Magnin-Robert¹. B Tisserant¹. M Hijri². J Fontaine¹

3 ¹Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV), Université du
4 Littoral Côte d'Opale, SFR Condorcet FR CNRS 3417, 50, Rue Ferdinand Buisson, 62228
5 Calais Cedex, France

6 ² Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques,
7 Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

8 * **Correspondence:** lounes@univ-littoral.fr (A. Lounès-Hadj Sahraoui)

9 **Abstract**

10 Little is known about the influence of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculum origin
11 on the phytoremediation efficiency. Therefore, the aim of this study was to compare the effect
12 of two mycorrhizal inocula (indigenous and commercial inocula) in association with alfalfa
13 and tall fescue on (1) the plant growth, (2) the Bacterial, Fungal and Archaeal communities
14 and on (3) the removal of dioxin/furan (PCDD/F) from an aged-polluted soil after 24 weeks of
15 culture in microcosms. Our results showed that both mycorrhizal indigenous and commercial
16 inocula were able to colonize alfalfa and tall fescue roots, and the growth response to
17 symbiotic efficiency depends on the AMF inoculum. Nevertheless, the improvement of root
18 biomass in inoculated alfalfa with indigenous inoculum and in inoculated tall fescue with
19 commercial inoculum was clearly correlated with the highest colonization rate of the roots in
20 these both plants. The highest shoot biomass was obtained in inoculated alfalfa and tall fescue
21 with the commercial inoculum. AMF inoculation affected differently the number of bacterial
22 and archaeal OTUs and bacterial diversity, with a higher bacterial and archaeal OTUs and
23 bacterial diversity were observed in the presence of the indigenous inoculum. Mycorrhizal
24 inoculation increases the abundance of bacterial OTUs (in particular with indigenous
25 inoculum) and microbial richness but it does not improve PCCD/F dissipation. Plantation has
26 no effect on abundance of microbial OTUs nor on richness but stimulates specific
27 communities (Planctomycetia, Solibacteres and Pezizomycetes) likely to be involved in the
28 dissipation of PCDD/F. The reduction of toxic equivalency (TEQ) concentration could be also
29 explained by the stimulation of soil microbial activities, dehydrogenase (DHA) and
30 fluorescein diacetate (FDA).

31 **Keywords:** phytoremediation, mycorrhizae, inoculum origin, microbial community,
32 dioxins/furans

33 **Introduction**

34 Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD) and polychlorinated dibenzofurans (PCDF),
35 collectively termed dioxins, are the most toxic group of persistent organic pollutants (POP)
36 (Faiad et al., 2016). Composed of two aromatic rings linked via one (PCDF) or two atom of
37 oxygen (PCDD) and one to eight related chlorine atoms; these halogenated compounds are
38 structurally very stable and extremely hydrophobic (Hanano et al., 2015). Dioxins become
39 ubiquitous pollutants because they are formed during industrial processes or during
40 incineration of domestic wastes (Kulkarni et al., 2008). According to US Environmental
41 protection agency (USEPA), PCDD/F are serious carcinogens which may destroy the immune
42 system of the human body and interfere with the hormone regulation (Gasiewicz and Park
43 2003). For ecological and economic considerations, the application of physico-chemical
44 strategies to remove dioxin remained under restrictions (Hanano et al., 2014). Therefore, one
45 of the most promising biological methods proposed to clean-up contaminated soil is
46 phytoremediation. The use of plants and associated rhizosphere to decontaminate polluted
47 sites is considered today, as a realistic, low-cost alternative for treatment of extensive areas of
48 pollution by organic chemicals (Revathi et al., 2011; Ali et al., 2013). This technology is
49 based on the catabolic potential of root-associated microorganisms, which are supported by
50 the organic substrates in root excretions and by a favorable micro-environment in the
51 rhizosphere (Galazka and Galazka. 2015). Among the plant species used in phytoremediation,
52 tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) have been widely
53 reported as model species for phytoremediation of soil contaminated by various POP such as
54 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) (Karlson et
55 al., 1998). Tall fescue has a well-developed root system and a wide adaptability to the
56 climatic and environmental conditions (Sun et al., 2011). Alfalfa is a biannual plant with a
57 high yield, deep root system and a high water consumption that could carry the pollutants to
58 the rhizosphere (Villacieros et al., 2003). Several studies reported the efficiency of
59 phytoremediation in removal of halogenated compounds such as PCB from artificial or aged
60 polluted soils (Chekol et al., 2004; Ionescu et al., 2009; Zeeb et al., 2006; Li et al., 2013). But,
61 very few studies are available on the phytoremediation of aged PCDD/F-polluted soils (Oh et
62 al., 2014). One of the reasons that limits phytoremediation application in PCDD/F-polluted
63 soil clean-up may be the high phytotoxicity of these contaminants. Indeed, it was showed that
64 PCDD/F inhibit seed germination and plant growth (Tangahu et al., 2011; Hanano et al.,
65 2014). Thus, the selection of appropriate plant species is crucial for the successful application

66 of this phytotechnology. They must be well adapted to the polluted-site conditions, tolerant to
67 the pollutant toxicity and able to enhance the contaminant-degradation potential of the soil by
68 stimulating microbial community with degradative capacity. One way to enhance the plant
69 adaptation to the contaminated soil could be the input of a biological amendment consisting of
70 arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Arbuscular mycorrhiza is a mutualistic symbiosis
71 between AMF, belonging to the Glomeromycota phylum, and 80 % of land plant species. It
72 was showed that AMF can facilitate plant establishment and survival in contaminated soils
73 and also contribute to increase POP biodegradation in the plant rhizosphere (Lenoir et al.,
74 2016a,b). It was also demonstrated that AMF inoculation influenced both the bacterial and
75 fungal community structures in the rhizosphere (Qin et al., 2016; Solís-Domínguez et al.,
76 2011) whether directly through excretion of fungal molecules such as carbohydrates (sugars
77 and organic acids) (Duponnois et al., 2008; Toljander et al., 2007; Qin et al., 2016) or
78 indirectly through changes in the composition and in the quantity of root exudates (Camprubi
79 et al., 1995). Recently, it was reported that mycorrhizal inoculation accelerated the dissipation
80 of PCB through modulation of bacterial growth and community compositions in the
81 mycorrhizosphere (Qin et al., 2016). Many studies have shown that some bacterial species
82 respond to the presence of certain AMF strains suggesting a high degree of specificity
83 between bacteria associated with AMF (Artursson et al., 2006 ; Trabelsi and Mhamdi, 2013).
84 AMF benefit in phytoremediation may depend upon the particular AMF species or isolates
85 used to inoculate the plants (Middleton et al., 2015). It was demonstrated that AMF isolated
86 from trace element-contaminated soils are able to tolerate greater pollutant concentrations
87 than those isolated from non-contaminated soils (Weissenhorn et al., 1995). In addition,
88 indigenous AMF are more adapted to local climatic and edaphic conditions and thus are more
89 likely to survive and propagate after transplanting than exogenous AMF (Rowe at al., 2007).
90 Del Val et al. (1999) reported six AM fungal ecotypes belonging to the genus *Glomus*, which
91 can exhibit different degree of metal tolerance ranging from very sensitive to relatively
92 tolerant. In 1999, Cabello showed that indigenous AMF isolates collected from fuel-oil
93 polluted areas improve the growth and phosphorus uptake by alfalfa cultivated on a
94 hydrocarbon polluted substrate much more effectively in comparison to plants inoculated with
95 laboratory AMF cultures. Orłowska et al. (2012) found that the phytoaccumulation of arsenic
96 in *Plantago lanceolata* L depends upon the AMF origin. In fact, the plant inoculation with the
97 indigenous isolate led to the increased transfer of arsenic from roots to shoots. Merier et al.
98 (2012) reported that the efficiency of phytoextraction of copper with *Oenothera picensis* and
99 *Imperata condensata* inoculated with a mixture of autochthonous Glomeromycota was higher

100 than *Glomus claroideum* inoculum which was isolated from agricultural soils and used as a
101 reference of non-Cu adapted AMF. However, no data are available concerning the
102 phytoremediation assisted with AMF on PCDD/F polluted soils. Up today, it is not known
103 whether the use of indigenous inoculum from contaminated soils could present more
104 advantages than exogenous inoculum from non-contaminated soil in the phytoremediation of
105 PCDD/F polluted soils. In this context, the present study aims at comparing the influence of
106 the mycorrhizal inoculum origin on (i) plant growth, (ii) microbial community structure
107 (bacteria, fungi and archaea) of PCDD/F-aged contaminated soil and (iii) the removal of the
108 pollutants. Thus, two arbuscular mycorrhizal inocula (indigenous one containing AMF strain
109 isolated from the aged PCDD/F-contaminated soil and a commercial one) associated with two
110 plants (alfalfa and tall fescue) were tested in microcosms for a period of 24 weeks of culture.

111 **Materials and methods**

112 **Experimental design**

113 **Soil characteristics**

114 The aged-polluted soil used in this study was obtained from a contaminated site localized near
115 an old incineration plant in activity for thirty years in Halluin, France (50° 45' 53" N. 3° 7'
116 43" E). The Topsoil (0-30 cm depth) was dried, sieved to 2 mm and homogenized. This soil
117 was sterilized (45 kGy. gamma rays) (Ionisos company, Sablé-sur-Sarthe) to eliminate AMF
118 propagules. The sterilized soil has the following basic characteristics: pH 6.34, total organic
119 carbon 25.1 g.kg⁻¹, total N 1.53 g.kg⁻¹, clay 135 g.kg⁻¹; silt : fine particle 149 g.kg⁻¹, silt :
120 coarse particle 431 g.kg⁻¹, sand : fine particle 257 g.kg⁻¹, sand : coarse particle 28 g.kg⁻¹, C/N
121 16.3; organic matter 43.4 g.kg⁻¹, total CaCO₃ <1 g.kg⁻¹. The total concentration of 17 toxic
122 PCDD/F congeners is 208±40 ng.kg⁻¹ dry soil, corresponding to 16 ng.TEQ.kg⁻¹ of soil.

123 **Mycorrhizal inocula**

124 Two types of AMF inoculum were used in this study. A commercial mix consisting of two
125 commercial inocula: FR140® (*Funneliformis mosseae*, MycAgro Ltd., France) and Solrize®
126 (*Glomus sp.*, Agrauxine Ltd., France) and an indigenous inoculum containing four AMF
127 species (*Glomus constrictum*, *Glomus lamellosum*, *Glomus geosporum* and *F. mosseae*). This
128 indigenous inoculum was obtained in an open pot culture of *Allium porrum* containing the
129 PCDD/F polluted-soil. After six months of plant growth the shoots were eliminated and
130 mycorrhizal roots plus soil containing spores and mycelium were mixed, air-dried for 3 days

131 and used as indigenous inoculum. While 30 g of each inoculum (10 propagules.g⁻¹ of inert
132 granular solid substrate) were added to appropriate pots, non-mycorrhizal treatments received
133 the same amount of autoclaved inoculum (twice at 121°C during 30 minutes). In each pots 5
134 ml aliquot of a filtrated soil solution (<40µm) were added in order to provide a general
135 microbial population free of AMF spores. This filtrate was obtained after imbibition of a non-
136 sterilized soil with demineralized water.

137 **Plants**

138 Two plant species - alfalfa (*Medicago sativa* L.) and tall fescue (*Festuca arundinacea*
139 Schreb.) were used. Seeds were pre-germinated on moist filter paper for about 1 week until
140 the radicles appeared and transplanted into pots. 10 pre-germinated seeds were sown in pots
141 containing 270g of polluted soil and 30 g of autoclaved inoculum (non-mycorrhizal
142 treatments) or non-autoclaved inoculum (mycorrhizal treatments). Non-planted pots were also
143 prepared in the same conditions. The experiment was set up with three replicates per
144 treatment for 24 weeks of culture.

145 **Determination of plant biomass**

146 After 24 weeks of culture, roots and shoots of inoculated or non-inoculated plants were
147 collected to estimate their dry weight. Roots were rinsed abundantly with sterile water. Shoot
148 and root were lyophilized during 48 hours until constant weighed to determine their biomass.

149 **AMF root colonization**

150 To quantify the AMF root colonization, fresh roots were carefully washed and cleared in
151 KOH (10 %) for 10 min at 90°C. The roots were rinsed in water and stained with trypan blue
152 (0.05 %) as described by Philips and Hayman (1970) and modified by Koske and Gemma
153 (1989). The percentage of mycorrhizal root was determined by microscopic examination of
154 stained root samples, using the method of McGonigle et al. (1990). The stained root fragments
155 were stored in a water/glycerol/lactic acid (1:1:1, v/v/v) solution until observation. Root
156 colonization was evaluated using the grid line intersect method (McGonigle et al., 1990). One
157 hundred thirty five root fragments from three different pots were observed under an optical
158 microscope (×100 magnification). Three intersections per root fragment were examined. In
159 total, more than 400 observations per treatment were analyzed, and total mycorrhizal
160 colonization was estimated.

161 **Extraction, analysis of soil PCDD/F content and TEQ values estimation**

162 EPA Method 8290 was used to determinate the residual levels of PCDD/F in microcosm soil.
163 10g of lyophilized soil and crushed to 2 mm were extracted. ASE Mode (Accelerated Solvent
164 Extraction) was used to extract PCDD/F with toluene, under heat (50°C) and pressure (103
165 bars). The levels of PCDD/F are determined by gas chromatography equipped with a high
166 resolution mass spectrometry detector (GC / HRMS). All samples were analyzed for 17
167 PCDD/F congeners recommended by World Health Organization (WHO, 2005). The Toxic
168 Equivalent (TEQ) values were calculated using measured PCDD/F concentrations and Toxic
169 Equivalency Factors (TEFs WHO-05). A TEQ value of a complex commercial of PCDD/F is
170 the sum of each congener multiplied by the TEF for that congeners (Dyke, 2003).

171 **Soil enzyme assays**

172 *Soil dehydrogenase (HDA) activity.* HDA was measured using a modified Tabatabai et al.
173 (1982) method. Dehydrogenases convert 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride to formazan.
174 Three replicate samples of Six g of sieved soil samples mixed with 0.06 g CaCO₃, 1 ml of a
175 3% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride and 2.5 ml distilled water. Samples were then
176 incubated for 24 h at 37°C. After incubation; 10 ml of methanol was added to each tube and
177 samples were vortexed. The tubes were then incubated 3 times for 1 h under horizontal
178 agitation (200 rpm) at room temperature. After centrifugation at 2000 rpm for 5 min, the
179 absorbance of the supernatant was read spectrophotometrically at 485 nm. Dehydrogenase
180 activities in the samples were calculated by using calibration graphs. Results are presented as
181 µg/g of soil/24h.

182 *Soil Fluorescein Diacetate (FDA) hydrolase.* FDA hydrolase activity was assayed using a
183 modified method of Adam and Duncan (2001). One g of fresh soil (sieved <2 mm) was
184 added with 7.5 ml of 60 mM potassium phosphate buffer pH 7.6 and 100 µl of 1 M FDA
185 substrate (Sigma-Aldrich). The commercial was incubated at 30°C on a rotary shaker at 50
186 rpm for 60 min. To stop the reaction 1 ml of acetone was then added immediately to 1 ml of
187 supernatant. The soil was removed from the incubation solution by centrifugation for 5 min at
188 10000 rpm. The amount of FDA hydrolysed was measured in using a spectrofluorimeter
189 (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific) (λ emission = 523 nm, λ excitation = 494 nm). FDA
190 hydrolase activities were calculated by using calibration standard graphs. Results are
191 presented as micrograms of fluorescein per gram soil.

192 **Soil DNA extraction and quantification**

193 Soil genomic DNA was extracted from 250 mg of soil using the NucleoSpin Soil (Macherey-
194 Nagel. Düren. Germany). The DNA quality from different samples was visualized by gel
195 electrophoresis on 1% agarose gels, and images of gels stained with Ethidium bromide
196 (Molecular Probes. Eugene. OR. USA) were captured with Gel Doc (BioRad. USA). The
197 Extracted DNA concentration was quantified with Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity
198 Assay Kit (Invitrogen. Carlsbad. CA). DNA concentrations were carried out according to the
199 protocol with High Sensitivity Quant-iT™ kit (Molecular Probes. Invitrogen. Paisley. UK).
200 The fluorescence was measured under a StepOne™ Real-Time PCR System (excitation 485
201 nm. emission 517 nm). From the data produced, a standard curve was plotted in Sigma Plot
202 and the concentration of all samples calculated. Quality of soil DNA extractions were checked
203 by electrophoresis on 1% agarose images of gels stained with GelRed (Molecular Probes.
204 Eugene. OR. USA) were captured with Gel Doc (BioRad. USA). All DNA extracts were
205 diluted to 0.5 ng.µl⁻¹ for subsequent analyses.

206 **PCR and Amplicon sequencing**

207 PCR amplification of 16S rDNA of Bacteria and Archaea were performed using respectively
208 primer pairs 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 805R (5'-
209 GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'), ARCH517F (5'-GCYTAAAGSRNCCGTAGC-3')
210 and ARCH909R (5'-TTTCAGYCTTGCGRCCGTAC-3'), and fungal ITS regions was
211 performed by using ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) and 58A2R (5'-
212 CTGCGTTCTTCATCGAT-3'). PCR reactions were achieved in a volume of 25 µl
213 containing 0.2 mM of dNTP, 0.6 µM of each primer, 1,25 µl of DMSO, 1 ng of DNA and
214 0.5U of *Taq* DNA polymerase (Roche, Mississauga, ON). PCR were run in a thermocycler
215 using the following parameters: initial denaturation at 94°C for 2 min, 30 cycles of 94°C for
216 30 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 30 sec and a final elongation at 72°C for 7 min. PCR
217 reaction, Barcode multiplexing and Illumina MiSeq were performed at the Genoem Quebec
218 Innovation Center at McGill University (Montreal, QC).

219

220

221

222 **Bioinformatic analysis**

223 The Illumina datasets were processed as described in Brazilian Microbiome Project
224 (<http://www.brmicrobiome.org/16s-profiling-pipeline-illumina>) with some modifications. The
225 partial 16S rRNA gene and ITS sequences were processed in Mothur (v.1.34.4) (Schloss et
226 al., 2009) and QIIME (v.1.9.1) (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et
227 al., 2010). The first part of the pipeline was performed in mother, it is composed of five steps:
228 i) forward and reverse sequences reads were merged within the *make.contigs* command, ii)
229 trim off primers with *trim.seqs* command, and iii) *trim.seqs* command was used for remove
230 singletons, iv) finally, merged file was separated into individual files for use in QIIME. The
231 next part was performed in QIIME. Sequences were chimera checked against the gold.fa
232 database (<http://drive5.com/uchime/gold.fa>) and clustered into Operational Taxonomic Units
233 (OTUs) according to their sequence similarity (97%) using the USEARCH v8.1. Reads were
234 first clustered against the Greengenes_13_8 16S rRNA gene database for bacteria and
235 archaea) and the HMM ITS rRNA gene database for fungi. Taxonomy was assigned to the
236 representative sequence of each OTUs using uclust with the Green genes 16S rRNA gene
237 database and HMM ITS rRNA gene database. Datasets were randomly standardized by
238 subsampling to the sample size that showed the lowest number of reads. The Relative
239 abundances were calculated with Excel on the different datasets to visualize the percentage of
240 the taxonomic affiliations across AMF inoculation and plant species. All Illumina MiSeq
241 databases generated in this study were deposited in the NCBI Sequence Read Archive and are
242 available under the project number (..)

243 **Statistical analysis**

244 Data were analyzed statistically by means of comparison by Mann-Whitney test using,
245 XLSTAT 19.01 (Addinsoft, France). Data of colonization percentages were converted to
246 arcsin values before Mann-Whitney test. Standard deviations were calculated by Microsoft
247 Office Excel 2007 for all data. In order to relate the changes in microbial community
248 composition to environmental variables, redundancy analysis (RDA) was used as
249 implemented in the CANOCO 4.5 software package (Biometris, Wageningen, The
250 Netherlands).

251

252

253 **Results**

254 **Mycorrhizal rate and plant biomass**

255 After 24 weeks of culture, while no mycorrhizal structures were observed in roots of plants
 256 cultivated on the non-inoculated soil, the mycorrhizal root colonization rates were dependent
 257 on the plant species ($P<0.0001$). The highest mycorrhizal root colonization rates were
 258 observed in alfalfa (58 and 70%) compared to tall fescue (28 and 40%) with commercial and
 259 indigenous inocula respectively. These mycorrhizal root colonization rates also depend on the
 260 inoculum origin ($P=0.005$) with highest mycorrhizal root colonization rates observed with
 261 indigenous inoculum (70%) in alfalfa. However, for tall fescue, the highest colonization rates
 262 were observed with a commercial inoculum (40%) compared to indigenous inoculum (28%)
 263 (Table 1). In regard to the morphological form of the roots systems between the two plants, a
 264 higher root biomass was effectively observed in alfalfa compared to tall fescue ($P<0.0001$) in
 265 our age-polluted soil. In parallel to the high root colonization rate observed for the
 266 combination of indigenous inoculum-alfalfa and commercial inoculum-tall fescue, a
 267 significant increase of root biomass were observed in alfalfa combined with indigenous
 268 inoculum and tall fescue combined with commercial inocula (Table 1). In the case of shoot
 269 dry weight, a difference of AMF effects on these organs was observed between plant species
 270 and it was very different from the effect observed on roots. The mycorrhizal inoculation led to
 271 an increase of shoot dry weight by 15 and 42% for inoculated alfalfa with commercial and
 272 indigenous inoculums respectively ($P=0.050$) with a highest increase with the commercial
 273 inoculum ($P=0.000$).

274 **Table 1** Total mycorrhizal root colonization, root and shoot dry weight of inoculated (I) and non-inoculated (NI)
 275 alfalfa and tall fescue with indigenous and commercial inoculum after 24 weeks of culture. P -values for
 276 mycorrhizal root colonization (plants species and AMF type), root and shoot dry weight (plants species, AMF
 277 type and AMF inoculation) according to Mann Whitney test. The bolded values are significant at $P\leq 0.05$. NC:
 278 not calculated.
 279

	Mycorrhizal root colonization (%)				Root dry weight (mg/plant)				Shoot dry weight (mg/plant)			
	Indigenous		Commercial		Indigenous		Commercial		Indigenous		Commercial	
	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
alfalfa	0	70±17	0	58±9	80±17	118±23	100±17	103±10	172±19	245±36	280±43	322±45
tall fescue	0	28±6	0	40±3	51±10	58±28	63±8	84±17	212±30	212±9	238±45	247±30
Plant species	<0.0001				<0.0001				0.190			
Mycorrhizal inoculation	NC				0.044				0.050			
Inoculum origin	0.005				0.190				0.000			

280

281 **Diversity of rhizosphere microbial communities**

282 Sequence processing and quality filtering allowed to obtain 330057 16S rDNA reads for
283 Bacteria in soil. They were clustered into 3672 OTUs (after excluding singletons). Number of
284 reads per sample ranged from 3852 to 13425. For fungi, we obtained a total of 1861555 ITS
285 reads that were clustered into 18419 OTUs (after excluding singletons). Number of reads per
286 sample ranged from 16918 to 73637. For Archaea, we obtained 248430 16S rDNA reads that
287 were clustered into 27 OTUs (after excluding singletons). Number of reads per sample ranged
288 from 526 to 19371. After 24 weeks of culture, the numbers of bacterial OTUs were about 699
289 and 686 in non-planted soil without indigenous and commercial inoculum respectively and
290 1039 and 686 in non-planted soil in the presence of indigenous and commercial inoculums
291 respectively (Table 2). Surprisingly, no statistically significant modulation of the following
292 parameters: the numbers of bacterial OTUs, richness (Chao estimator) or diversity (Shannon
293 index), were observed between planted vs unplanted soil and alfalfa vs tall fescue.
294 Nevertheless, the number of bacterial OTUs was increased by mycorrhizal inoculation
295 ($P=0.0001$), which differed according to the type of inocula ($P=0.048$, Table 2). Amendment
296 with indigenous inoculum increased the number of bacterial OTUs by 40 and 70% in soil
297 cultivated with alfalfa and tall fescue, respectively (Table 3). Moreover, an effect of the
298 amendment with indigenous inoculum was also observed on the unplanted soil, by 50%.
299 Similarly to bacterial OTUs, the bacterial richness (Chao1 estimator) and diversity (Shannon
300 index) increased significantly in the soil was planted with inoculated plants compared to the
301 non-inoculated ones ($P<0.0001$ and $P=0.030$ respectively, Table 2). The highest bacterial
302 diversity was observed with indigenous inoculum ($P=0.002$).

303

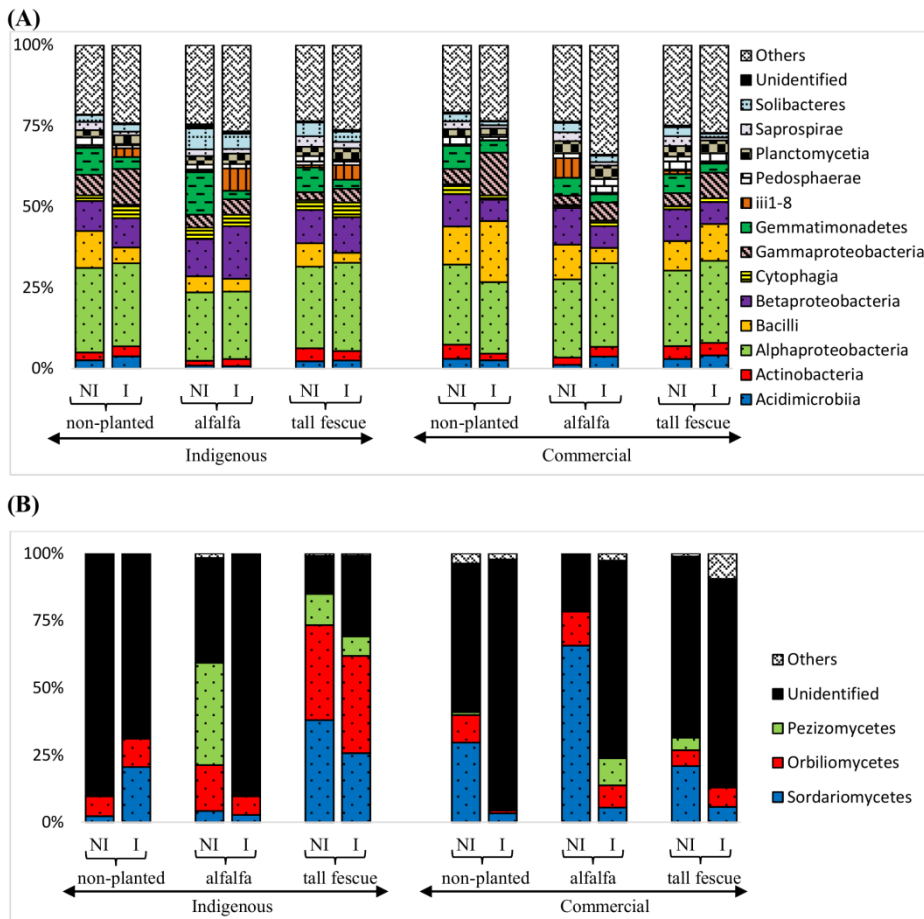
304 **Table 2:** Alpha diversity metrics for rhizosphere samples collected from controls: non-planted polluted soils
 305 (non-inoculated and inoculated) and treatments: planted polluted soils with non-inoculated and inoculated alfalfa
 306 and tall fescue. *P* values for observed OTUs, Chao1 richness estimate and Shannon diversity indices on the
 307 community structures of Bacteria, Fungi and Archaea (Plantation, plants species, mycorrhizal inoculation and
 308 inoculum origin) according to Mann-Whitney test. The bolded values are significant at $P < 0.05$.

309

			Observed OTUs		Chao1 richness estimate		Shannon diversity index	
			Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated
Bacteria	Indigenous	non-planted	699 ± 76	1039 ± 41	670 ± 83	1189 ± 115	7.4 ± 0.37	8.3 ± 0.19
		alfalfa	748 ± 38	1037 ± 39	773 ± 12	1183 ± 24	7.8 ± 0.08	8.2 ± 0.12
		tall fescue	665 ± 143	1120 ± 106	709 ± 62	1172 ± 69	7.6 ± 0.17	8.3 ± 0.17
	Commercial	non-planted	686 ± 35	686 ± 29	732 ± 34	789 ± 60	7.6 ± 0.01	7 ± 0.15
		alfalfa	707 ± 42	893 ± 165	749 ± 69	981 ± 213	7.4 ± 0.09	7.8 ± 0.19
		tall fescue	759 ± 33	798 ± 105	755 ± 18	874 ± 149	7.7 ± 0.19	7.3 ± 0.64
Archaea	Indigenous	non-planted	10 ± 1	15 ± 1	9.3 ± 0.6	12.3 ± 1.1	1.6 ± 0.37	2.1 ± 0.08
		alfalfa	13 ± 1	18 ± 0	9.8 ± 0.3	13.5 ± 3.5	0.8 ± 0.2	1.4 ± 0.57
		tall fescue	11 ± 4	16 ± 1	9 ± 3.6	12.6 ± 2.5	1.1 ± 0.23	1.9 ± 0.14
	Commercial	non-planted	9 ± 2	14 ± 1	9.3 ± 2	11.8 ± 4	0.9 ± 0.12	2 ± 0.33
		alfalfa	11 ± 3	12 ± 2	7.3 ± 1.5	10.5 ± 1	1 ± 0.41	1.7 ± 0.16
		tall fescue	7 ± 3	14 ± 3	6.3 ± 2	11.2 ± 1	1.1 ± 0.39	2 ± 0.18
Fungi	Indigenous	non-planted	600 ± 156	706 ± 170	1612 ± 678	1286 ± 442	0.9 ± 0.42	1.7 ± 0.34
		alfalfa	575 ± 208	620 ± 55	4221 ± 5062	873 ± 303	1.6 ± 1.07	0.8 ± 0.14
		tall fescue	768 ± 466	689 ± 244	3732 ± 3241	3237 ± 2143	2.2 ± 0.12	3.3 ± 0.85
	Commercial	non-planted	590 ± 94	606 ± 155	3781 ± 2866	1108 ± 217	1.9 ± 0.68	1.3 ± 0.05
		alfalfa	763 ± 122	624 ± 186	12146 ± 12206	1251 ± 319	1.9 ± 0.44	2.6 ± 1.17
		tall fescue	386 ± 81	511 ± 227	1829 ± 859	2263 ± 2154	1.4 ± 0.66	2 ± 0.94
Bacteria	Plantation		0.075		0.261		0.356	
	Plant species		1.000		0.341		0.795	
	Mycorrhizal inoculation		0.001		<0.0001		0.030	
	Inoculum origin		0.048		0.211		0.002	
Archaea	Plantation		0.448		0.710		0.033	
	Plant species		0.503		0.861		0.436	
	Mycorrhizal inoculation		<0.0001		0.000		0.000	
	Inoculum origin		0.034		0.088		0.912	
Fungi	Plantation		0.725		0.430		0.111	
	Plant species		0.204		0.707		0.020	
	Mycorrhizal inoculation		0.704		0.006		0.716	
	Inoculum origin		0.304		0.537		0.716	

310
 311 A taxonomic assignment of OTUs allowed us to identify at least 14 dominant bacterial classes
 312 in the aged PCCD/F contaminated soil (Fig 1A). The bacterial community was dominated by
 313 members of the classes Alphaproteobacteria (25%), Bacilli (11%), Betaproteobacteria (9%),

314 Gemmatimonadetes (8%) and Gammaproteobacteria (6%) in non-planted soil. In this
 315 analysis, the plantation has a negative impact on the classes Bacilli and Gammaproteobacteria
 316 ($P=0.050$ and 0.001 , respectively), and a positive impact on Planctomycetia and Solibacteres
 317 ($P<0.0001$ and 0.005 respectively). Moreover, Actinobacteria, Alphaproteobacteria and
 318 Acidimicrobiia were significantly affected by plant species ($P=0.001$, 0.002 and 0.007
 319 respectively), with a higher relative abundance in tall fescue compared to alfalfa (Fig. 1A,
 320 Table 3).



321
 322 **Figure 1** Relative abundances of major bacterial classes (A) and fungal classes (B) in the aged polluted soil
 323 cultivated with alfalfa and tall fescue inoculated or not with indigenous and commercial inoculum after 24 weeks
 324 of culture.

325
 326 The mycorrhizal inoculation significantly selected Gammaproteobacteria ($P=0.001$) and led to
 327 the decrease of Gemmatimonadetes ($P<0.0001$), Saprospirae ($P<0.0001$) and Solibacteres
 328 ($P=0.035$). Furthermore, inoculum origin significantly affected the classes Acidimicrobiia,
 329 Bacilli, Betaproteobacteria, Cytophagia, Pedosphaerae and Solibacteres ($P=0.041$, 0.001 ,
 330 0.002 , <0.0001 , 0.013 and 0.000 respectively, Table 3). A highest abundance of
 331 Acidimicrobiia, Bacilli and Pedosphaerae were observed when the soil was inoculated with

332 commercial inoculum, whereas Betaproteobacteria, Cytophagia, and Solibacteres were
 333 increased when the soil was inoculated with indigenous inoculum.

334 In the case of the Archaeal communities, the number of the OTUs were significantly
 335 positively impacted by mycorrhizal inoculation ($P<0.0001$). Moreover, the level of this
 336 impact appeared to be variable according to the inoculum origin ($P=0.034$). Archaeal richness
 337 and diversity increased in the soil cultivated with inoculated plants compared to non-
 338 inoculated ones ($P=0.000$, 0.000 , Table 2). Thaumarchaeota classes clearly dominated the
 339 archaeal community in all the samples (about 99%), and no significant differences were found
 340 in the relative abundance of this domain between different treatments (data not shown).

341 In fungal community, no effect of plantation, plant species, mycorrhizal inoculation and
 342 inoculum origin were observed on the numbers of fungal OTUs (Table 2). However, fungal
 343 richness (Chao1 estimator) significantly increased by mycorrhizal inoculation ($P=0.006$,
 344 Table 2). Fungal richness was decreased in inoculated soil except in the presence of
 345 inoculated tall fescue with commercial inoculum, although, no impact of inoculum origin on
 346 fungal richness was observed. Fungal diversity (Shannon index) was influenced significantly
 347 by plant species ($P=0.020$) with a highest diversity in tall fescue compared to alfalfa in
 348 indigenous inoculum condition and lowest in tall fescue compared to alfalfa in commercial
 349 inoculum condition.

350

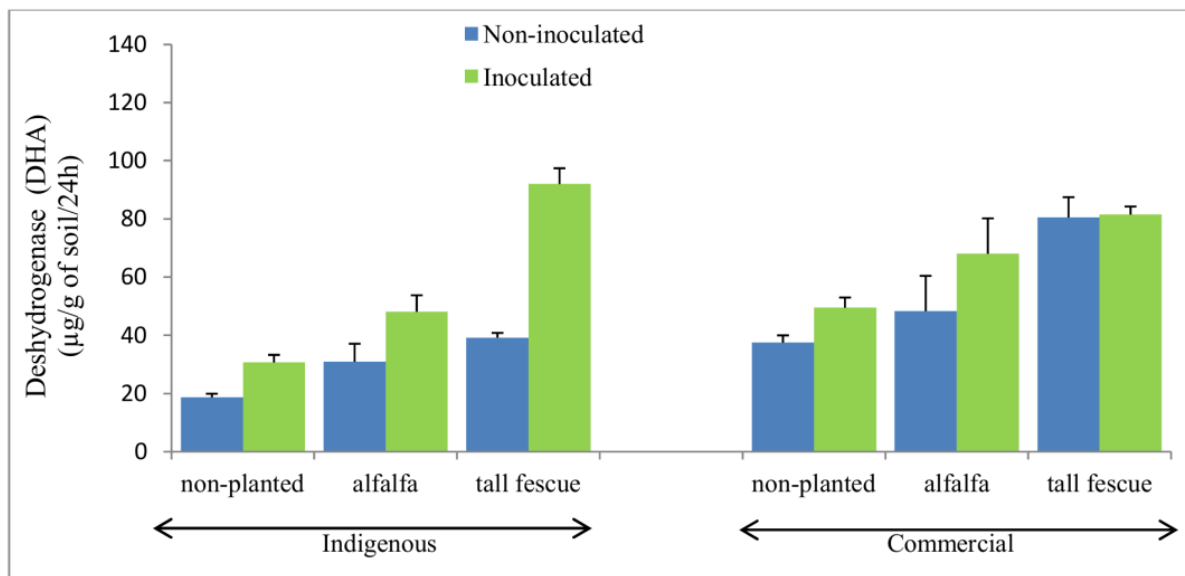
351 **Table 3:** *P* values for community structures of bacterial and fungal (plants species, plantation, AMF inoculation
 352 and Inoculum origin) according to Mann-Whitney test. The bolded values are significant at $P<0.05$.

	Taxa	Plantation	Plant species	Mycorrhizal inoculation	Inoculum origin
Bacteria	Solibacteres	0.005	0.175	0.035	0.000
	Saprospirae	0.535	0.312	<0.0001	0.351
	Planctomycetia	<0.0001	0.403	0.052	0.457
	Pedosphaerae	0.430	0.112	0.150	0.013
	iii1-8	0.135	0.285	0.692	0.141
	Gemmatimonadetes	0.196	0.931	<0.0001	0.517
	Gammaproteobacteria	0.001	0.751	0.001	0.477
	Cytophagia	0.356	0.795	0.211	<0.0001
	Betaproteobacteria	0.234	0.544	0.150	0.002
	Bacilli	0.050	0.403	0.069	0.001
	Alphaproteobacteria	0.275	0.002	0.580	0.669
	Actinobacteria	1.000	0.001	0.602	0.097
Acidimicrobiia	0.084	0.007	0.117	0.041	
Fungi	Sordariomycetes	0.234	0.089	<0.0001	0.235
	Orbiliomycetes	0.154	0.214	0.477	0.085
	Pezizomycetes	0.000	0.931	0.133	0.558

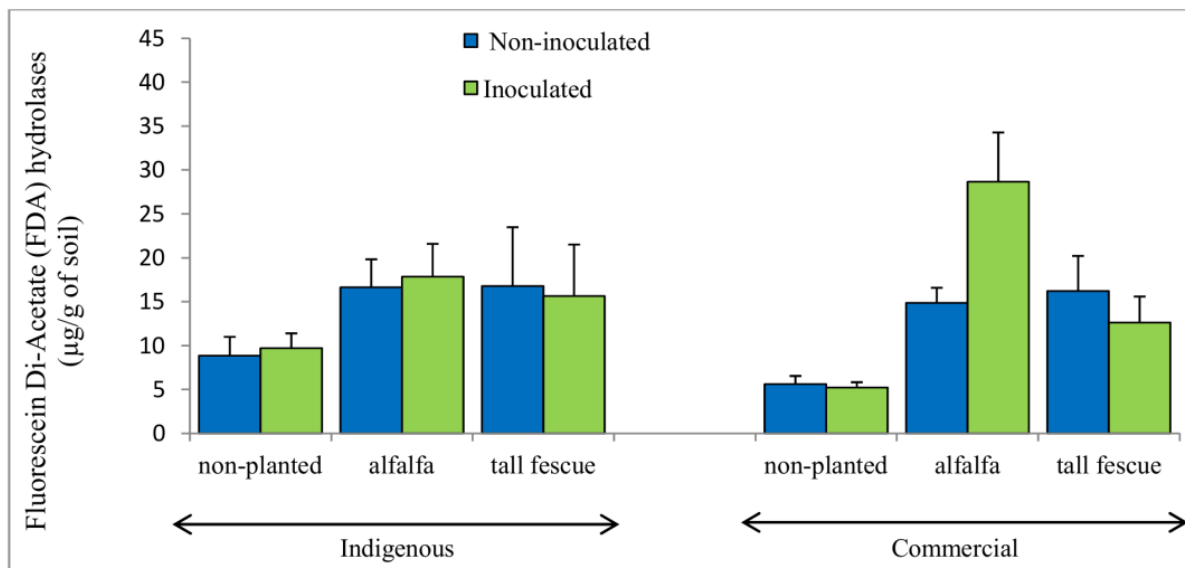
353

354 Three dominant fungal classes were identified in the polluted soil, Sordariomycetes,
 355 Orbiliomycetes and Pezizomycetes (Fig 1B). Pezizomycetes classes were influenced by plant
 356 species ($P=0.000$), with a highest abundance in the presence of alfalfa compared to tall fescue
 357 (Table 3). Sordariomycetes classes were affected by mycorrhizal inoculation ($P<0.0001$) with
 358 a lowest abundance when the soil was inoculated with both indigenous and commercial
 359 inoculums (Fig 1B). Orbiliomycetes classes were not affected by plantation, plant species,
 360 mycorrhizal inoculation and inoculum origin (Table 3).

(A)



(B)



361

362 **Figure 2** Soil dehydrogenases (A) and Fluorescein di-acetate hydrolases (B) activities in non-planted soil or
 363 planted soil with inoculated or non-inoculated alfalfa or tall fescue with indigenous or commercial inoculums
 364 after 24 weeks of culture.

365

366 **Soil microbial activities**

367 Soil DHA and FDA activities under different treatments are presented in Figure 2. The DHA
 368 activity increased significantly when the soil was planted ($P<0.0001$, Table 4), especially with
 369 tall fescue ($P=0.001$, Table 4) (from 2.1 to 3-fold, Fig. 2A). The association of the plants with
 370 AMF led to increase the DHA activity in the soil ($P=0.000$), the impact of the mycorrhizal
 371 inoculum was particularly striking with the indigenous inoculum ($P=0.001$) (2.3-fold). The
 372 plantation has a positive impacted on the soil FDA activities ($P<0.0001$) and varied according
 373 to the plant species ($P=0.013$). The plantation increased FDA activities by 2 and 3-fold in
 374 indigenous and commercial inoculums condition respectively (Fig. 2B). No significant effects
 375 of mycorrhizal inoculation and inoculum origin on FDA activities were observed (Table 4).

376

377 **Table 4:** *P* values for TEQ, DHA and FDA according to Mann Whitney test. The bolded values are significant at
 378 $P\leq 0.05$. Values are means \pm s.d.

	Plantation	Plant species	Mycorrhizal inoculation	Inoculum origin
DHA	<0.0001	0.001	0.000	0.001
FDA	<0.0001	0.013	0.684	0.511
TEQ	<0.0001	0.078	0.752	0.962

379

380 **Total PCDD/F concentrations**

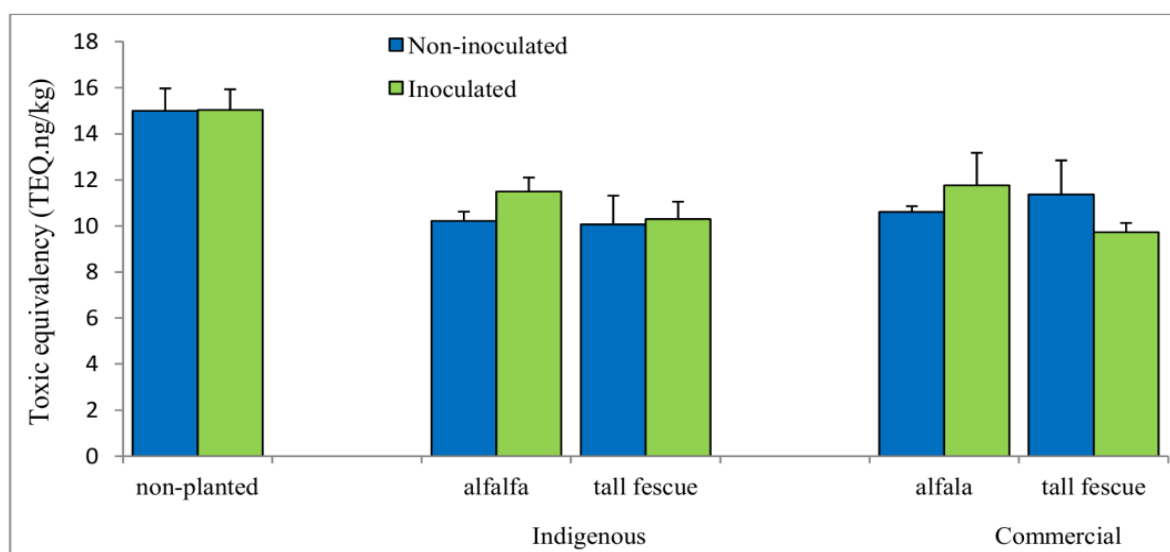
381

382 After 24 weeks of culture, total TEQ PCDD/F concentrations in non-planted soils (inoculated
 383 or non-inoculated) were about 15 ng TEQ.kg⁻¹ (Fig. 3). Significant decreases, ranging from 22
 384 to 35%, were observed in total PCDD/F concentrations in planted microcosms compared to
 385 the non-planted ones ($P<0.0001$). Moreover, plant species was slightly ($P=0.078$) affected
 386 TEQ concentrations with a lower TEQ PCDD/F concentrations (9.7 TEQ.ng.kg⁻¹) was
 387 observed in inoculated tall fescue compared to inoculated alfalfa (11.8 TEQ.ng.kg⁻¹).
 388 Mycorrhizal inoculation and inoculum origin did not have any effect on TEQ PCDD/F
 389 concentration (Table 4).

390

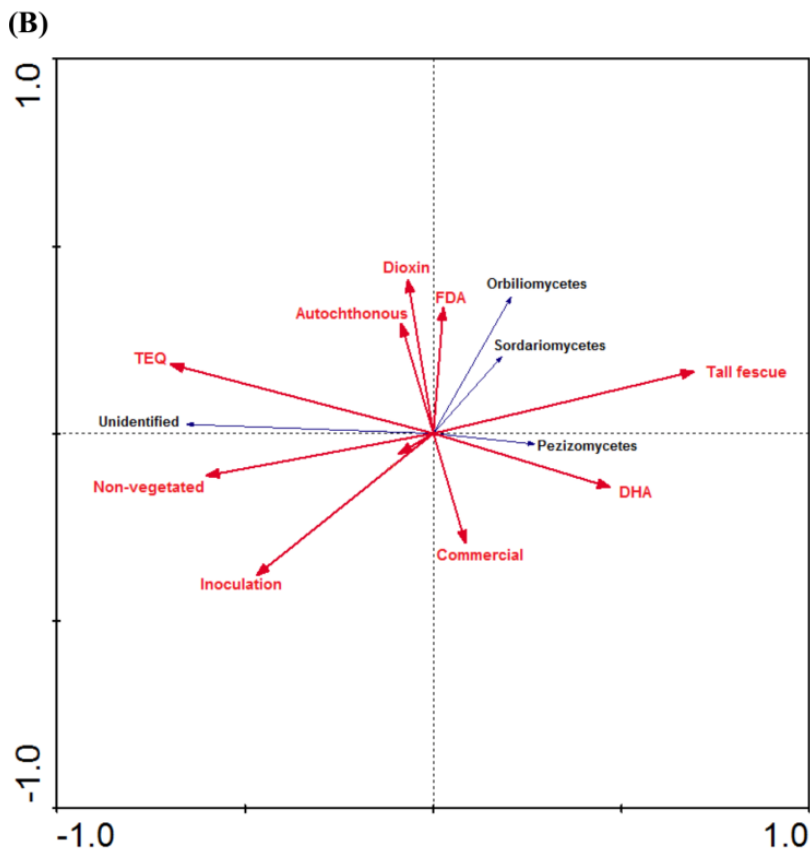
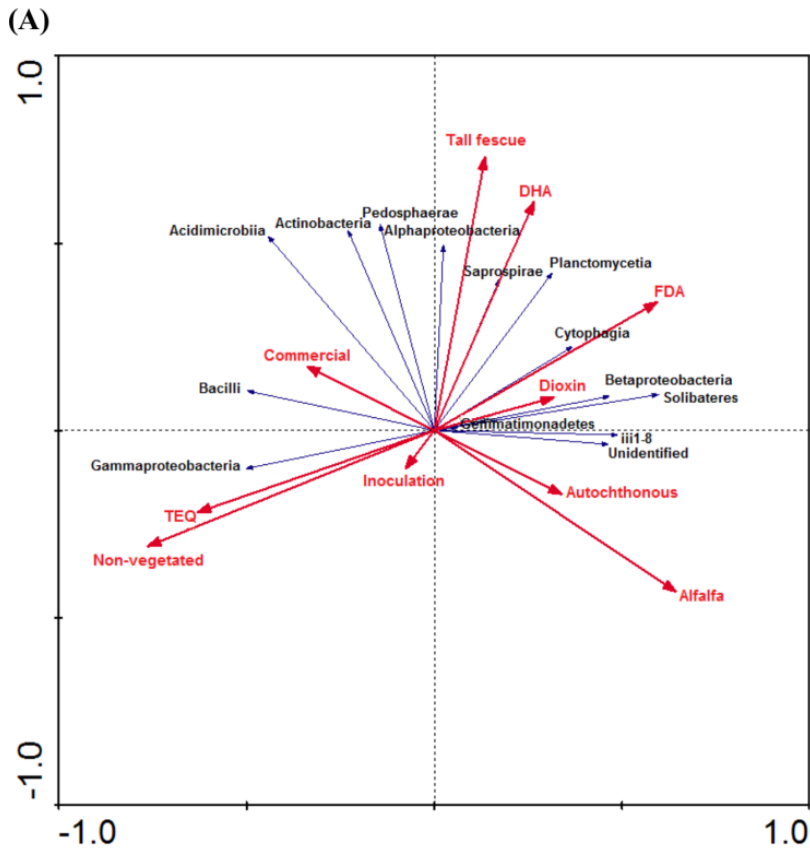
391 In order to determine to what extent the following parameters: FDA and DHA activities,
 392 alfalfa, tall fescue, non-planted soil, TEQ, dioxins, indigenous and commercial inoculums,
 393 affected the microbial community compositions, both bacterial and fungal communities were
 394 analyzed by redundancy analysis (RDA). According to RDA, the first two canonical axes for
 395 bacterial explained 12.2% and 10.5% of the variation in the species dataset, respectively. For
 396 fungal species dataset, 32.6% and 1.8% of the variation were explained by the first two
 397 canonical axes. Approximate 1/3 of the variation both in the bacterial and fungal species

398 dataset (28.5% and 36.5%) were explained by all four significant canonical axes. The
 399 proportion rose to 30.3 and 36.6% of the variation in the species data were explained by all
 400 canonical axes, respectively. In addition, RDA indicated that the relative abundance of some
 401 microbial classes, such as Gammaproteobacteria ($P=0.003$) was correlated positively with
 402 PCDD/F concentration (ng.TEQ.kg^{-1}), while Planctomycetia ($P=0.008$) and Solibacteres
 403 ($P=0.015$) and Pezizomycetes ($P=0.003$) (Fig. 4A, B) were correlated negatively with
 404 PCDD/F concentration (ng.TEQ.kg^{-1}). Additionally, Planctomycetia ($P=0.008$) was positively
 405 correlated with DHA activity. Gammaproteobacteria ($P=0.004$) was correlated with low FDA
 406 activity, while Betaproteobacteria ($P=0.012$), iii1-8 ($P=0.032$), Planctomycetia ($P=0.018$) and
 407 Solibacteres ($P=0.000$) were correlated with increasing FDA activity (Fig. 4A).



408
 409 **Figure 3** Total PCDD/F concentrations (ng.TEQ/Kg) after 24 weeks of culture in non-planted and planted soils
 410 with inoculated and non-inoculated alfalfa or tall fescue with indigenous or commercial inoculums.
 411

412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421



422

423 **Figure 4** Redundancy analysis (RDA) of the rhizosphere bacterial (A) and fungal communities (B) in relation to
 424 mycorrhizal inoculation, inoculum origin, vegetation, plant species, soil microbial activity and pollution. TEQ:
 425 Toxic equivalency PCDD/F concentrations, DHA Dehydrogenase, FDA: Fluorescein diacetate.

426 **Discussion**

427 Little is known about the influence of AMF inoculum origin on the phytoremediation
428 efficiency. Therefore, in the present study, we compared the effect of two mycorrhizal inocula
429 (based on mixtures of indigenous and a commercial AMF taxa) in association with two plants
430 (alfalfa and tall fescue) on (1) the plant growth, (2) the microbial rhizosphere community
431 structure (Bacteria, Archaea and Fungi) and soil enzymatic activities, and on (3) the removal
432 of PCDD/F from an aged polluted soil after 24 weeks of culture in microcosms.

433 The commercial inoculum used in this study consisted on a mixture of *Funneliformis mosseae*
434 and *Glomus sp.* while the indigenous inoculum contained four AMF species (*Glomus*
435 *constrictum*, *Glomus lamellosum*, *Glomus geosporum* and *Funneliformis mosseae*) isolated
436 from the aged PCCD/F-contaminated soil. Our results showed that the indigenous and the
437 commercial mycorrhizal inocula used were able to colonize the both plants tested (alfalfa and
438 tall fescue) despite the presence of PCDD/F in the soil (16 ng.TEQ.Kg⁻¹), with a higher
439 colonization rate in alfalfa roots than in tall fescue ones. In fact, these results are in
440 accordance with those of Zhou et al. (2013), which reported a higher mycorrhizal rate of
441 alfalfa roots (21%) than tall fescue ones (7%) in sterilized PAH-contaminated soil in the
442 presence of a commercial inoculum formed of *R. intraradices*. Interestingly, the highest
443 mycorrhizal rate in alfalfa was obtained with the indigenous inoculum, while the highest
444 mycorrhizal rate in tall fescue was observed with the commercial inoculum. These results
445 clearly indicated that, although to the evident adaptive capacity of indigenous inoculum to
446 local edaphic conditions, the plant genotype constitutes another factor to explain the
447 difference of mycorrhizal rates between alfalfa and tall fescue. However, Cabello (1999) did
448 not observe any significant difference in mycorrhizal rate of alfalfa roots inoculated with three
449 various indigenous AMF species (*Glomus deserticola*, *Glomus geosporum*, *Glomus*
450 *intraradices*) collected from fuel oil polluted soil and two laboratory fungal cultures (*Glomus*
451 *fasciculatum* and *Funneliformis mosseae*). Conversely, a lack of correlation between plant
452 growth parameters and colonization rates were observed by these authors. Nevertheless, in
453 our experimental conditions, the improvement of root dry weight in inoculated alfalfa with
454 indigenous inoculum and in inoculated tall fescue with commercial inoculum, was clearly
455 correlated with the highest colonization rate of the roots in both plant species tested.
456 Concerning the aerial parts, the highest shoot biomass was obtained whatever the plant
457 species with the commercial inoculum. In this sense, Smith and Smith (1996) indicated that
458 the effect of AMF on plant growth can vary from negative to positive impact and is clearly
459 dependent on plant species and AMF strains/isolates. AMF inoculation appeared to affect the

460 plant growth through a direct and positive impact on the plant abilities to absorb mineral
461 nutrients and water and/or a modulation of microbial community composition, in particular by
462 selecting plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) including *Bacillus* and *Pseudomonas*
463 species (Frey-Klett et al., 2007). In the current study, whereas only archaeal diversity index
464 was increased by the soil plantation, inoculation by both mycorrhizal inocula, induced
465 increases of bacterial and archaeal OTUs numbers, richness and diversities. Previous works
466 showed that bacterial community composition in soil was different in the presence or absence
467 of AMF hyphae (Mansfeld-Giese et al., 2002; Marschner and Baumann, 2003). Indeed, the
468 composition of the bacterial populations linked to the AMF spores could be predominantly
469 influenced by a specific spore wall composition or AMF compounds rather than by specific
470 root exudates (Roesti et al., 2005). Moreover, the extraradical mycelium of AMF also
471 influences the chemical composition and pH of the soil (Bago & Azcon-Aguilar, 1997), and
472 releases substances into the soil (Wright et al., 1996; Wright & Upadhyaya, 1996). Selective
473 enrichment for Gammaproteobacteria in the soil of mycorrhizal inoculated plant was observed
474 in our study and was already observed by Toljander and Colleagues (2007), which described
475 an overrepresentation of this class among the taxa that responded positively to arbuscular
476 mycorrhizal mycelial exudates in axenic cultures. Moreover, mycorrhizal inoculation
477 decreased significantly Gemmatimonadetes, Saprospirae and Solibacteres abundances in the
478 aged PCDD/F-polluted soil. In this way, Rodriguez-Coballero et al. (2017) mentioned that
479 introduction of *Glomus intraradices* in the soil planted with *Lavandula dentata* L., *Thymus*
480 *vulgaris* L. and *Santolina chamaecyparissus* L. affected negatively the abundance of
481 Gemmatimonadetes. No effect of mycorrhizal inoculation was observed on fungal
482 communities except on richness. We observed only a negative impact of AMF inoculation on
483 the fungal Sordariomycetes order. Similar negative effect on Sordariomycetes was previously
484 reported by Iffis et al (2016) in a planted petroleum hydrocarbon-polluted soil inoculated with
485 AMF (*Diversispora* gen.). So far, few data are available concerning the impact of AMF
486 species and inoculum origin on microbial populations of PCDD/F-polluted soil. Our results
487 showed that the mycorrhizal inocula from two different origins affected differently the
488 number of bacterial and archaeal OTUs and bacterial diversity. Higher bacterial and archaeal
489 OTUs and bacterial diversity were observed in the presence of the indigenous inoculum
490 compared to the commercial one. However, no effect of inoculum origin was observed on
491 fungal OTUs, diversity and richness. Similarly, Solís- Domínguez et al. (2011) reported that
492 mycorrhizal inoculum origin (indigenous and commercial) influenced differently bacterial and
493 fungal community structures in the rhizosphere after 60 days of culture of mesquite plants.

494 Our results clearly indicated that the origin of mycorrhizal inoculum modulate differently
495 bacterial classes. Whereas commercial inoculum enhanced Acidimicrobiia, Bacilli and
496 Pedosphaerae classes, indigenous inoculum increased Betaproteobacteria, Cytophagia, and
497 Solibacteres. This result could also be due to the contribution of the bacteria associated with
498 AMF inocula.

499 Soil microbial communities play an important role in the biodegradation of polluted soil. In
500 fact, the redundancy analysis indicated that the relative abundance of some microbial classes,
501 such as Planctomycetia and Solibacteres and Pezizomycetes were correlated negatively with
502 TEQ PCDD/F concentration, which means that either these bacterial and fungal classes could
503 be involved in the PCDD/F dissipation or they are less tolerant to the PCCD/F toxicity. In our
504 conditions, significant decreases, ranging from 22 to 35%, were observed in TEQ
505 concentrations in planted microcosms compared to the non-planted ones. However, plant
506 species and mycorrhizal inoculation did not have any effect on TEQ PCDD/F concentration
507 whatever the origin of the inoculum. The majority of studies focused on phytoremediation of
508 PCB-soil (Passatore et al., 2014) and very few studies are available on the phytoremediation
509 of aged PCDD/F-contaminated soil. Only Wang and Oyaizu (2009) showed that clover
510 reduced significantly dibenzofuran (DBF) in spiking soil after 8 weeks of culture.

511 In the present work, the reduction of TEQ concentration could be also explained by the
512 stimulation of soil microbial activities. Indeed, our findings showed that the planted soil with
513 alfalfa and tall fescue induced soil DHA and FDA activities. These enzyme activities are
514 considered suitable indicators of PCB, HAP, diesel oil and BTEX (benzene, toluene, ethyl
515 benzene, and xylene) biodegradation (Margesin et al., 2000; Tu et al., 2011; Margesin, 2005).
516 In fact, Tu et al. (2011) concluded that alfalfa planting enhanced the degradation of soil PCBs
517 by stimulating the general microbial activities in the soil measured as DHA and FDA
518 activities. Similar results were also described by Sun et al (2011) who showed that alfalfa and
519 tall fescue increased significantly DHA activity in PAH-polluted soil after 7 months of
520 phytoremediation. Macek et al. (2000) reported that plants can accelerate bioremediation by
521 releasing secondary compounds including simple sugars, amino acids and flavonoids that
522 stimulate the growth of specific microbial communities in the soil or possibly induce enzyme
523 systems of existing bacterial populations. For example, the class Gammaproteobacteria and
524 Bacilli reported as PCDD/F-degraders (Hiraishi. 2003, Chen et al., 2013). The Planctomycetia
525 class was parts of microbial community associated with bioremediation of soil contaminated
526 with the chlorinated pollutants (Futamata et al., 2004; Cea et al., 2010; Petric et al., 2011).
527 Indeed, ours results showed that Planctomycetia was correlated negatively with TEQ PCDD/F

528 concentration, this increase of Planctomycetia class may be correlated with a decrease in TEQ
529 PCDD/F concentration.

530

531 **Conclusion**

532 Our study demonstrated that although mycorrhizal inoculation increased the diversity, the
533 richness and the number of bacterial and archaeal OTUs, with a higher bacterial and archaeal
534 OTUs and bacterial diversity observed in the presence of the indigenous inoculum compared
535 to the commercial one, it did not improve PCDD/F dissipation in comparison with the non-
536 inoculated planted soil after 24 week- culture. However, our findings showed that the
537 plantation is an appropriate means to enhance the PCDD/F dissipation in soil. Alfalfa and tall
538 fescue enhanced the dissipation of soil PCDD/F by stimulating the general microbial activities
539 in the soil measured as DHA and FDA activities and the growth of specific microbial
540 communities potentially involved in the degradation of PCDD/F such as Gammaproteobacteria
541 and Bacilli or Planctomycetia class. Further studies to investigate the contribution of these
542 specific communities in rhizoremediation will lead to better understanding and application of
543 this sustainable phytotechnology.

544 **Acknowledgments**

545 *Experiments presented in this paper were carried out using the CALCULCO computing*
546 *platform, supported by SCoSI/ULCO (Service COmmun du Système d'Information de*
547 *l'Université du Littoral Côte d'Opale).*

548

549 **References**

550 Adam G, Duncan H (2001) Development of a sensitive and rapid method for the measurement
551 of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol*
552 *Biochem* 33:943-951

553 Ali H, Khan E, Sajad MA (2013). Phytoremediation of heavy metals-Concepts and
554 applications. *Chemosphere* 91:869–881. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.075

555 Artursson V, Finlay RD, Jansson JK (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal
556 fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ Microbiol*
557 8:1–10. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x.

558 Cabello,MN (1999) Effectiveness of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) isolated
559 from hydrocarbon polluted soils. *J Basic Microbiol* 39:89-95.

560 Camprubi A, Calvet C, Estaun V (1995). Growth Enhancement of *Citrus reshni* after
561 inoculation with *Glomus-Intraradices* and *Trichoderma aureoviride* and associated

- 562 effects on microbial populations and enzyme activity in potting mixes. *Plant Soil* 173:
563 233–238
- 564 Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al (2010). QIIME allows analysis of
565 highthroughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335–336.
566 doi:10.1038/nmeth.f.303
- 567 Cea M, Jorquera M, Rubilar O, Langer H, Tortella G, Diez MC (2010). Bioremediation of soil
568 contaminated with pentachlorophenol by *Anthracyllum discolor* and its effect on soil
569 microbial community. *J Hazard Mater* 181:315–323. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.05.013.
- 570 Chekol T, Vough LR, Chaney RL (2004). Phytoremediation of polychlorinated biphenyl-
571 contaminated soils: The rhizosphere effect. *Environ Int* 30:799–804.
572 doi:10.1016/j.envint.2004.01.008.
- 573 Chen W-Y, Wu J-H, Lin Y-Y, Huang H-J, Chang J-E (2013). Bioremediation potential of soil
574 contaminated with highly substituted polychlorinated dibenzo-p-dioxins and
575 dibenzofurans: microcosm study and microbial community analysis. *J Hazard Mater*
576 261:351–61. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.07.039.
- 577 Del Val C, Barea JM, Azcón-Aguilar C (1999). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus
578 populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl Environ Microbiol* 65:718–723.
- 579 Duponnois R, Galiana A, Prin Y (2008) The mycorrhizosphere effect: a multitrophic
580 interaction complex improves mycorrhizal symbiosis and plant growth, mycorrhizae:
581 sustainable agriculture and forestry. pp. 227-240.
- 582 Faiad W, Hanano A, Kabakibi MM, Abbady AQ (2016). Immuno-detection of dioxins using a
583 recombinant protein of aryl hydrocarbon receptor (AhR) fused with sfGFP. *BMC*
584 *Biotechnol* 16:1–11. doi:10.1186/s12896-016-0282-9.
- 585 Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New*
586 *Phytol* 176:22–36. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x.
- 587 Futamata H, Uchida T, Yoshida N, Yonemitsu Y, Hiraishi A (2004). Distribution of
588 dibenzofuran-degrading bacteria in soils polluted with different levels of polychlorinated
589 dioxins. *Microbes Environ* 19:172–177. doi:10.1264/jsme2.19.172.
- 590 Galazka A, Galazka R (2015). Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils
591 artificially polluted using plant-associated-endophytic bacteria and *Dactylis glomerata* as
592 the bioremediation plant. *Polish J Microbiol* 64:241–252.
- 593 Hanano A, Almously I, Shaban M (2014). Phytotoxicity effects and biological responses of
594 *Arabidopsis thaliana* to 2,3,7,8-tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin exposure.
595 *Chemosphere* 104:76–84. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.10.060.
- 596 Hanano A, Almously I, Shaban M, Moursel N, Shahadeh A, Alhajji E (2015). Differential
597 tissue accumulation of 2,3,7,8-Tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin in *Arabidopsis thaliana*
598 affects plant chronology, lipid metabolism and seed yield. *BMC Plant Biol* 15:193.
599 doi:10.1186/s12870-015-0583-5.

- 600 Hiraishi A (2003) Biodiversity of Dioxin-Degrading Microorganisms and Potential Utilization
601 in Bioremediation. *Microbes Environ* 18:105–125.
- 602 Iffis B, St-Arnaud M, Hijri M (2016) Petroleum hydrocarbon contamination, plant identity
603 and arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) community determine assemblages of the
604 AMF spore-associated microbes. *Environ Microbiol* 18:2689–2704. doi:10.1111/1462-
605 2920.13438.
- 606 Ionescu M, Beranova K, Dudkova V, Kochankova L, Demnerova K, Macek T, Mackova M
607 (2009) Isolation and characterization of different plant associated bacteria and their
608 potential to degrade polychlorinated biphenyls. *Int Biodeterior Biodegrad* 63:667–672.
609 doi:10.1016/j.ibiod.2009.03.009.
- 610 Karlson U, Dowling DN, O’Gara F, Rivilla R, Bittens M, Francesconi S Pritchard HC,
611 Pedersen HC (1998) “Development of Self-Contained Plant/GMM Systems for Soil.”
612 *Bioremediation. Past, Present and Future Risk Assessment When Using GMO’s.* pp. 23–
613 31.
- 614 Koske RE, Gemma JN (1989) A modified procedure for staining roots to detect VA
615 mycorrhizas. *Mycol Res* 92:486–488. doi:10.1016/S0953-75628980195-9.
- 616 Kulkarni PS, Crespo JG, Afonso CAM (2008) Dioxins sources and current remediation
617 technologies - A review. *Environ Int* 34:139–153. doi:10.1016/j.envint.2007.07.009.
- 618 Lenoir I, Fontaine J, Lounès-Hadj Sahraoui A (2016) Arbuscular mycorrhizal fungal
619 responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry* 123:4–15.
620 doi:10.1016/j.phytochem.2016.01.002.
- 621 Lenoir I, Lounès-Hadj Sahraoui A, Frédéric L, Yolande D, Joël F (2016) Arbuscular
622 mycorrhizal wheat inoculation promotes alkane and polycyclic aromatic hydrocarbon
623 biodegradation: Microcosm experiment on aged-contaminated soil. *Environ Pollut*
624 213:549–560. doi:10.1016/j.envpol.2016.02.056.
- 625 Li Y, Liang F, Zhu Y, Wang F (2013) Phytoremediation of a PCB-contaminated soil by
626 alfalfa and tall fescue single and mixed plants cultivation. *J Soils Sedi* 13:925–931.
627 doi:10.1007/s11368-012-0618-6.
- 628 Macek T, Macková M, Káš J (2000) Exploitation of plants for the removal of organics in
629 environmental remediation. *Biotechnol Adv* 18:23–34. doi:10.1016/S0734-
630 9750(99)00034-8.
- 631 Mansfeld-Giese K, Larsen J, Bodker L (2002) Bacterial populations associated with
632 mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *FEMS Microbiol*
633 *Ecol* 41:133–140. doi:FEM133 [pii]10.1111/j.1574-6941.2002.tb00974.x.
- 634 Margesin R, Zimmerbauer A, Schinner F (2000) Monitoring of bioremediation by soil
635 biological activities. *Chemosphere* 40:339–346. doi:10.1016/S0045-6535(99)00218-0.

- 636 Marschner P, Baumann K (2003) Changes in bacterial community structure induced by
637 mycorrhizal colonisation in split-root maize. *Plant Soil* 251:279–289.
638 doi:10.1023/A:1023034825871.
- 639 McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA (1990) A new method which
640 gives an objective measure of colonization of roots by vesicular- arbuscular mycorrhizal
641 fungi. *New Phytol* 115:495–501. doi:10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x.
- 642 Meier S, Borie F, Curaqueo G, Bolan N, Cornejo P (2012) Effects of arbuscular mycorrhizal
643 inoculation on metallophyte and agricultural plants growing at increasing copper levels.
644 *Appl Soil Ecol* 61:280–287. doi:10.1016/j.apsoil.2011.10.018.
- 645 Middleton EL, Rihardson S, Koziol L, Palmer CE, Yermakov ZY, Henning JA, Schultz PA,
646 Bever JD (2015) Locally adapted arbuscular mycorrhizal fungi improve vigor and
647 resistance to herbivory of native prairie plant species. *Ecosphere* 6:1–16.
648 doi:10.1890/ES15-00152.1.
- 649 Oh K, Cao T, Li T, Cheng H (2014) Study on Application of Phytoremediation Technology in
650 Management and Remediation of Contaminated Soils. *J Clean Energy Technol* 2:216–
651 220. doi:10.7763/JOCET.2014.V2.126.
- 652 OrłowskaE, Godzik B, Turnau K (2012) Effect of different arbuscular mycorrhizal fungal
653 isolates on growth and arsenic accumulation in *Plantago lanceolata* L. *Environ Pollut*
654 168:121–130. doi:10.1016/j.envpol.2012.04.026.
- 655 Passatore L, Rossetti S, Juwarkar AA, Massacci A (2014) Phytoremediation and
656 bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): State of knowledge and research
657 perspectives. *J Hazard Mater* 278:189–202. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.05.051.
- 658 Petrić I, Bru D, Udiković-Kolić N, Hršak D, Philippot L, Martin-Laurent F (2011). Evidence
659 for shifts in the structure and abundance of the microbial community in a long-term
660 PCB-contaminated soil under bioremediation. *J Hazard Mater* 195:254–260.
661 doi:10.1016/j.jhazmat.2011.08.036.
- 662 Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic
663 and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br*
664 *Mycol Soc* 55:158–IN18. doi:10.1016/S0007-15367080110-3.
- 665 Qin H, Brookes PC, Xu J (2016) Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae alter soil bacterial
666 community and enhance polychlorinated biphenyls dissipation. *Front Microbiol* 7:1–10.
667 doi:10.3389/fmicb.2016.00939.
- 668 Revathi, K, Haribabu TE, Sudha PN (2011). Phytoremediation of chromium contaminated
669 soil using sorghum plant. *Int J Environ Sci* 2:417–428. doi:10.6088/ijes.00202020005.
- 670 Rodríguez-Caballero G, Caravaca F, Fernández-González AJ, Alguacil MM, Fernández-
671 LópezM, Roldán A (2017) Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation mediated changes
672 in rhizosphere bacterial community structure while promoting revegetation in a semiarid
673 ecosystem. *Sci Total Environ* 585:838–848. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.128.

- 674 Rowe HI, Brown CS, Claassen VP (2007) Comparisons of mycorrhizal responsiveness with
675 field soil and commercial inoculum for six native montane species and *Bromus*
676 *tectorum*. *Restor Ecol* 15:44–52.
- 677 Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA,
678 Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Horn DJ, Van
679 Weber CF (2009) Introducing mothur: open source, platform-independent, community-
680 supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and*
681 *Environmental Microbiology* 75: 7537-7541. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01541-09>.
- 682 Smith FA, Smith SE (1996) Mutualism and parasitism: diversity in function and structure in
683 the arbuscular (VA) mycorrhizal symbiosis. In: Callow, J.A. (Ed.). *Advances in*
684 *Botanical Research*, Vol. 22, London, Academic Press, pp. 1-43.
- 685 Solís-Domínguez FA, Valentín-Vargas A, Chorover J, Maier RM (2011) Effect of arbuscular
686 mycorrhizal fungi on plant biomass and the rhizosphere microbial community structure
687 of mesquite grown in acidic lead/zinc mine tailings. *Sci Total Environ* 409:1009–1016.
688 doi:10.1016/j.scitotenv.2010.11.020.
- 689 Sun M, Fu D, Teng Y, Shen Y, Luo Y, Li Z, Christie P (2011) In situ phytoremediation of
690 PAH-contaminated soil by intercropping alfalfa (*Medicago sativa* L.) with tall fescue
691 (*Festuca arundinacea* Schreb.) and associated soil microbial activity. *J Soils Sedi*
692 11:980–989. doi:10.1007/s11368-011-0382-z.
- 693 Tabatabai MA (1982) Soil enzymes. In *Methods of Soil Analysis. II. Chemical and*
694 *Microbiological Properties*, eds A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeney, 2nd edn., pp.
695 903-947. American Society of Agronomy, Madison.
- 696 Tangahu BV, Sheikh Abdullah SR, Basri H, Idris M, Anuar N, Mukhlisin M (2011) A review
697 on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *Int J*
698 *Chem Eng* 2011. doi:10.1155/2011/939161.
- 699 Toljander JF, Lindahl BD, Paul LR, Elfstrand M, Finlay RD (2007) Influence of arbuscular
700 mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. *FEMS*
701 *Microbiol Ecol* 61:295–304. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00337.x.
- 702 Trabelsi D, Mhamdi R (2013) Microbial inoculants and their impact on soil microbial
703 communities: a review. *Biomed Res Int* 2013:1–11. doi:10.1155/2013/863240.
- 704 Tu C, Teng Y, Luo Y, Sun X, Deng S, Li Z, Liu W, Xu Z (2011) PCB removal, soil enzyme
705 activities, and microbial community structures during the phytoremediation by alfalfa in
706 field soils. *J Soils Sedi* 11:649–656. doi:10.1007/s11368-011-0344-5.
- 707 Urbaniak M, Wyrwicka A, Zieliński M, Mankiewicz-Boczek J (2016). Potential for
708 phytoremediation of PCDD/PCDF-contaminated sludge and sediments using
709 Cucurbitaceae plants: a pilot study. *Bull Environ Contam Toxicol* 97:401–406.
710 doi:10.1007/s00128-016-1868-6.
- 711 Villaceros M, Power B, Sánchez-Contreras M, Lloret J, Oruezabal RI, Martín M, Fernández-
712 Piñas F, Bonilla I, Whelan C, Dowling DN, Rivilla R (2003). Colonization behaviour of

713 *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*)
714 rhizosphere. *Plant Soil* 251:47–54. doi:10.1023/A:1022943708794.

715 Wang Y, Oyaizu H (2009). Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species
716 for dibenzofuran-contaminated soil. *J Hazard Mater* 168:760–764.
717 doi:10.1016/j.jhazmat.2009.02.082.

718 Weissenhorn I, Leyval C, Belgy G, Berthelin J (1995) Arbuscular mycorrhizal contribution to
719 heavy metal uptake by maize (*Zea mays* L.) in Pot Culture with contaminated soil.
720 *Mycorrhiza* 5:245-251.

721 Wilke BM (2005). Determination of chemical and soil properties. In: Margesin R and
722 Schinner F, editors, *Manual for soil analysis: Monitoring and assessing soil*
723 *bioremediation*. Springer, Heidelberg. p. 47–95. doi:10.1007/3-540-28904-6_2

724 Zeeb BA, Amphlett JS, Rutter A, Reimer KJ (2006) Potential for phytoremediation of
725 polychlorinated biphenyl-(PCB)-contaminated soil. *Int J Phytorem* 8:199-221.
726 doi.org/10.1080/15226510600846749.

727 Zhou X, Zhou J, Xiang X (2013) Impact of four plant species and arbuscular mycorrhizal
728 (AM) fungi on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in spiked soil. *Polish*
729 *J Environ Stud* 22:1239–1245. Available at:
730 <http://www.pjoes.com/pdf/22.4/Pol.J.Environ.Stud.Vol.22.No.4.1239-1245.pdf>.

731

732 **Supplementary data**

733

734 Supplementary Table 1: Redundancy analysis results of bacterial and fungal.

	Axis	Eigen values	Species-environment correlations	Cumulative % variation of species	Cumulative % variation of species-environment	Sum of all canonical Eigen values
Bacteria	1	0.122	0.753	12.2	40.2	0.303
	2	0.105	0.519	22.7	74.8	
	3	0.041	0.599	26.8	88.5	
	4	0.017	0.398	28.5	94.1	
Fungi	1	0.326	0.643	32.6	89.5	0.365
	2	0.018	0.404	34.4	94.5	
	3	0.017	0.464	36.0	99.0	
	4	0.004	0.387	36.4	100	

Présentation de la publication 3

Compte tenu des taux de dissipation des PCDD/F obtenus lors des deux études précédentes et étant donné que l'efficacité de la phytoremédiation dépend, notamment, des propriétés physico-chimiques des polluants, de leur biodisponibilité, de la tolérance aux polluants des espèces végétales mais aussi du potentiel dégradant du microbiote du sol, nous avons essayé dans cette dernière publication de combiner plusieurs stratégies afin de lever certains de ces verrous dans l'objectif d'améliorer le taux de dissipation des PCDD/F:

- La biodégradation des polluants organiques persistants est généralement limitée dans les sols historiquement pollués en raison de leur faible biodisponibilité (Vergani et al., 2017). Afin de pouvoir suivre plus aisément la dégradation des PCDD/F, la teneur en PCDD/F biodisponibles et totaux a été augmentée artificiellement en ajoutant au sol historiquement contaminé un extrait organique complexe issu du sol d'Halluin, ce qui nous a permis d'augmenter la concentration en PCDD/F du sol d'environ 25% atteignant ainsi une concentration de 266 ng/kg dans le sol.
- De nombreux travaux ont montré l'intérêt des biosurfactants dans le cadre de la phytoremédiation des sols contaminés par les POP (Pei et al., 2010 ; Zhang et al., 2010 ; Zeng et al., 2011). Ces composés amphiphiles biosourcés présentent une grande propriété de désorption, une absence de toxicité et sont biodégradables (Viisimaa et al., 2013). Ils permettent d'accroître la biodisponibilité des polluants dans les sols historiquement pollués (Zhang et al., 2010 ; Grant et al., 2011). Cependant, l'application de tensioactifs pour améliorer la phytoremédiation des sols contaminés par les PCDD/F, a été très peu étudiée jusqu'à présent (Cheema et al., 2016). C'est pourquoi, dans le cadre de cette expérimentation, des rhamnolipides ont été introduits dans le sol deux jours après le lancement des cultures, de telle façon à obtenir une concentration finale de 100 mg/kg de sol.
- L'introduction de souches spécifiques ou de consortia microbiens présentant une aptitude à la biodégradation des polluants organiques, isolés généralement de sols historiquement pollués, peut permettre d'accroître l'efficacité de phytoremédiation des sols pollués par les POP (Li et al., 2011). Cette stratégie s'est révélée performante dans la remédiation des sols pollués par les hydrocarbures (Yu et al., 2011), mais aucune donnée n'est disponible concernant son efficacité dans la bioremédiation des sols contaminés par les PCDD/F. C'est pourquoi, dans le cadre de cette étude, la bactérie *S. wittichii* RW1, décrite pour ses capacités de dégradation

des PCDD/F (Bunge et al., 2008) a été introduite dans le sol 4 jours après le lancement de la culture par arrosage des pots avec 5 ml d'une solution bactérienne à $3,2 \cdot 10^8$ CFU/ml.

Ainsi, nous nous proposons, dans le cadre du travail décrit dans la publication 3, de tester l'intérêt de la phytoremédiation assistée par une combinaison d'amendements dans la dépollution des sols historiquement contaminés par les PCDD/F. En plus de l'introduction d'un inoculum mycorhizien, nous avons ajouté un biosurfactant (les rhamnolipides), les microorganismes autochtones du sol contaminé ainsi que la bactérie à capacité dégradante *S. wittichii* RW1. Cette expérimentation a été menée dans des microcosmes végétalisés avec de la luzerne contenant un sol stérilisé par rayons γ pendant 24 semaines de culture. En plus, la cytotoxicité du sol contaminé a été mesurée avant et après phytoremédiation.

Une dissipation de 48 ng/kg de PCDD/F (soit 23% de la teneur totale en PCDD/F) a été observée dans le sol végétalisé et amendé par l'inoculum mycorhizien, la bactérie *S. wittichii* RW1, les rhamnolipides et la microflore autochtone. Cette dissipation concerne en particulier quatre congénères, l'OCDD, la 1234678-HepCDD, la 1234678-HepCDF et l'OCDF et résulterait majoritairement d'une biodégradation étant donné que les quantités de PCDD/F bioaccumulées dans les racines ainsi que le taux de transfert dans les parties aériennes sont faibles voire négligeables. Nos résultats montrent que cette dissipation des PCDD/F a lieu de manière concomitante avec la stimulation de l'activité microbienne du sol (mise en évidence par les activités enzymatiques FDA et DHA) et avec l'augmentation de l'abondance, de la richesse et de la diversité bactérienne, ainsi que de la richesse fongique. Plusieurs ordres ou classes connus pour être impliqués dans la dégradation PCDD/F comme les Actinobactéries, Proteobactéries, Chloroflexi pour les bactéries ou Sordariales pour les champignons sont positivement corrélés à la dissipation des PCDD/F dans notre sol. En outre, parallèlement à cette dissipation des PCDD/F, une réduction de la toxicité du sol contaminé après la phytoremédiation assistée a pu être mise en évidence grâce à la réalisation des tests de cytotoxicité.

Enhancing dioxin/furan dissipation in an aged contaminated soil using microbes-assisted phytoremediation and biosurfactant

Hacène Meglouli¹, Joël Fontaine¹, Anthony Verdin¹, Maryline Magnin-Robert¹, Benoît Tisserant¹, Mohamed Hijri², Anissa Lounès-Hadj Saharaoui^{1*}

¹ Univ. Littoral Côte d'Opale, UCEIV-EA 4492, SFR Condorcet FR CNRS 3417, CS 80699, F-62228, Calais cedex, France

² Institut de Recherche en Biologie Végétale, Univ. de Montréal and Jardin botanique de Montréal, 4101 Rue Sherbrooke Est, Montréal, QC H1X 2B2, Canada

* Corresponding author. Email-address: lounes@univ-littoral.fr

Abstract

Phytoremediation of aged PCDD/F-contaminated soil was carried out in microcosm experiments planted with alfalfa and combined with four treatments: arbuscular mycorrhizal inoculation with *Funneliformis mosseae*, a biosurfactant amendment with rhamnolipids, PCDD/F degrading-bacterium *S. wittichii* RW1 and indigenous microflora (μ f). A reduction of 23% of total PCDD/F content was observed in the planted soil combined with four treatments (Fm+RW1+Rh+ μ f). In details, the content of 4 PCCD/F congeners appeared to be particularly decreased by this combined treatments, OCDD, 1234678-HepCDD, 1234678-HepCDF and OCDF. Our study reported that the PCCD/F dissipation resulted from the stimulation of soil microbial activity (FDA and DHA) and the increasing of bacterial abundance (OTUs), richness and diversity, as well as fungal richness. Amplicon sequencing using Illumina MiSeq analysis detected several orders or classes known to be involved in PCCD/F degradation such as Actinobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi in bacteria or Sordariales in fungi. Cytotoxicity studies confirmed reduced toxicity of the contaminated soil after assisted phytoremediation. Our investigation demonstrated the phytoremediation efficiency of PCDD/F-contaminated soils can be enhanced using selected microbes.

Keywords: phytoremediation, dioxin/furan, microbial community, arbuscular mycorrhiza fungi, biosurfactant

1. Introduction

Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD) and polychlorinated dibenzo-furans (PCDF), are persistent chlorinated organic compounds rank among the priority environmental contaminants in the world (Hägglom and Bossert, 2003). These halogenated compounds are by-products of numerous chemical processes such as combustion, incineration, metal processing, chemical manufacturing and various industrial processes (Rocha et al., 2016). Composed of two aromatic rings linked via one (PCDF) or two atom of oxygen (PCDD) and one to eight related chlorine atoms, these halogenated chemicals are structurally very stable and extremely hydrophobic (Hanano et al., 2015). Due to their persistence, humans may become exposed to dioxins mainly through food and less by inhalation or dermal contact (Pollitt, 1999). Moreover, their extreme persistence in the environment and ability to bioconcentrate in the food chain makes them great environmental and human health risks that need remedial action. Due to the fact that physico-chemical remedial technologies are expensive and disruptive, there is a growing interest in developing new remediation technologies that are environment friendly and less expensive (Cunningham et al., 1993). Phytoremediation is defined as an emerging technology using selected plants associated to their microbiote to clean up the contaminated environment and is proposed as a cost-effective method for the removal of many contaminant classes such as petroleum hydrocarbons, pesticides and chlorinated compounds (Rissato et al., 2015). A limited number of studies are available on the phytoremediation of soil contaminated by PCDD/F. Among these studies, only one reported by Wang and Oyaizu (2009) who showed the ability of white clover to remove dibenzofuran after two months of culture. However, a variety of plant species have been investigated and successfully used for the remediation of other organic contaminants. For example, alfalfa was described in the literature for its phytoremediation performances for persistent organic pollutants, such as PCB due to its extensive root systems as well as its high adaptability and tolerance to survive in stressed environments (Villacieros et al., 2003; Fan et al., 2008; Rezek et al., 2008). Plant roots can enhance the degradation of chlorinated organic pollutants in soils thanks to the root exudates which stimulate microbial metabolism in the rhizosphere (Ionescu et al., 2009; Uhlik et al., 2013). This is mainly attributed to a co-metabolism pathway. However, phytoremediation efficiency is often limited because of their toxicity to the plants and/or to the low pollutant bioavailability to the rhizosphere microbial populations in regard to the high adsorption of the PCDD/F on soil organic matter (Hanano et al., 2014; Urbaniak et al., 2016). To enhance the desorption rate of organic pollutants, various extraction agents such as biosurfactants have been used to improve the efficiency of phytoremediation. Indeed, these amphiphilic compounds have many advantages over synthetic surfactants in remediation for contaminated soils, such as high-efficiency, non-toxicity and biodegradability (Viisimaa et al., 2013).

Several studies have demonstrated that biosurfactants can increase the desorption of hydrophobic contaminants from soil organic matter and make them available for biodegradation (Shin et al., 2006; Nayak et al., 2009; Bharali et al., 2011). However, the application of surfactants for enhanced phytoremediation of organic pollutants, especially chlorinated compounds, in soils has received very little attention in the literature so far (Cheema et al., 2016). Thus, the phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil using biosurfactants such as rhamnolipids (bacterial glycolipids) was reported (Zhang et al., 2010; Liu et al., 2010). On the other hand, it was showed that arbuscular mycorrhiza fungi (AMF) could also improve phytoremediation effectiveness by providing protection to the plants against the pollutant toxicity and by enhancing pollutant dissipation (Lenoir et al., 2016a,b). Indeed, AMF are beneficial for the growth and the survival of plants in polluted soils where they facilitate plant nutrition and water uptake (Binet et al. 2000). Some investigations showed that AMF can also contribute to increase the biodegradation of chlorinated pollutants such as PCB in the plant rhizosphere (Teng et al., 2010; Yu et al., 2011). Indeed, AMF are indirectly involved in bioremediation processes through the so-called mycorrhizosphere effect, which stimulate soil microbial activity, improve soil structure and contribute to the overall degradation of pollutants (Joner and Leyval, 2003).

Finally, another way to enhance phytoremediation efficacy relies on the improvement of the degradative capacity of contaminated soil through the introduction of specific strain or microbial consortia (Liu et al., 2010). This strategy has proven to be successful in cleaning up hydrocarbon-polluted soil (Yu et al., 2011) but no data are available concerning its efficiency in PCDD/F-contaminated soil bioremediation. The degradation of highly chlorinated congeners is restricted to a few strains, such as *Sphingomonas wittichii* RW1, *Pseudomonas mendocina* NSYSU and *Pseudallescheria boydii* (Nam et al., 2006; Field et al., 2008; Marco-Urrea et al., 2015). For example, *S. wittichii* RW1 is a microorganism of great interest in the bioremediation of polluted soils for its ability to biotransform a large number of toxic polychlorinated dioxins (Halden et al., 1999; Nam et al., 2006). This strain uses dioxygenase-catalyzed angular ring hydroxylation to oxidize several chlorinated PCDD/F and to rapidly mineralize DD/F (Wittich et al., 1992; Keim et al., 1999). Although the potential role of surfactants and/or microorganisms such as pollutant degradative bacteria and AMF is largely accepted in the litterature, we need to extend our understanding on ecological implication of the complex interation between plant-rhizosphere microbiome and polluted soils. Thus, in the present study, a microcosm phytoremediation experiment using alfalfa combined with four treatmants (AMF, rhamnolipids, *S. wittichii* RW1 and reintroduction of native microflora) was conducted with PCDD/F aged polluted soil. The objectives of this study were to (1) enhance PCDD/F dissipation conditions, (2) assess the soil toxicity and (3) study the impact of the

combination (alfalfa, AMF, rhamnolipids, *S. wittichii* RW1 and microflora) on the rhizosphere microbiome structure using 16S rRNA gene and ITS1 region amplicon sequencing with Illumina MiSeq.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design and set-up

In December 2013, soil samples were collected on 0-30 depth from a PCDD/F-contaminated site which is located at Halluin in northern France (50° 45' 53" N, 3° 7' 43"E), near an old incineration plant in activity for thirty years. The polluted soil was dried, homogenized and sieved through a 2mm. This soil was sterilized (45 kGy, gamma rays) (Ionisos company, Sablé-sur-Sarthe) to eliminate indigenous microorganisms. The physico-chemical properties of the sterilized soil are : pH 6.34, clay, 135 g/kg, sand, 257 and 28 g/kg for fine and coarse particle respectively, silt, 149 and 431 g/kg for fine and coarse particle, organic carbon, 25.1 g/kg, total nitrogen, 1.53 g/kg, organic matter, 43.4 g/kg, total CaCO₃, <1, P₂O₅, 0.027 g/kg, Mn, 415 g/kg, Ca, 0.565 g.100/g, Na, 0.697 g.100/g, Al, 3.74 g.100/g, Fe, 2.06 g.100/g, Si, 0.207 g.100/g and Mg, 0.281 g.100/g. The soil contained 208 ng of \sum 17 PCDD/F congeners per kg of dry weight soil, correspond to 15 ng TEQ/kg. PCDD/F content was artificially increased by spiking the soil with an organic extract. The extract was prepared with toluene using the microwave-assisted extraction procedure from the contaminated soil of Halluin to reach 266 ng/kg concentration in the soil. Six treatments were designed with three replicates of each treatments as Table 1.

The control microcosms were not planted and contained doped sterilized soil. Planted microcosms pots (400 mL, diameter 7.5 cm) were sown with 10 pre-germinated seeds of alfalfa. AMF-inoculated microcosms contained 270 g of the polluted soil and 30 g of commercial AMF (10 propagules/g) consisting of *Funneliformis mosseae* (Fm, MycAgro Ltd., France). For AMF non-inoculated conditions, the pots contained 270 g of the polluted soil mixed with 30 g of autoclaved commercial AMF inoculum (two times at 121°C during 30 minutes). *S. wittichii* RW1 was kindly provided by Mrs Hartmann of the CEA laboratory of Marcoule (France). This strain is described for its degradation abilities of PCDD/F (Megharaj et al., 1997, Nam et al., 2006). The bacterial strain was isolated from an agar medium on a Petri dish and then cultured in a liquid LB medium for 48 h with agitation (50 rpm) at 37°C. After centrifugation at 1000 rpm for 5 min, the bacterial pellet was taken up in a Bushnell-Haas solution. Each culture pot received a volume of 5 ml of the bacterial solution at 3.2 10⁸ CFU/ml. A solution of rhamnolipids (Rh), glycolipids containing L-rhamnose and β -

hydroxyl fatty acids (AGAE Technologies, USA) is added after 1 week of culture in the pots to obtain a final concentration of 100 mg/kg of soil. The indigenous microflora, except mycorrhizal fungi were introduced by adding 10 ml per pot of non-sterile soil suspension filtered at 20 μ m.

Table 1 Treatments of experimental design.

	Control	Alfalfa (A)	<i>F. mosseae</i> (Fm)	<i>S. wittichii</i> (RW1)	Rhamnolipids (Rh)	Indigenous microflora (μ f)
Non-planted	+					
A		+				
A+Fm		+	+			
A+Fm+RW1		+	+	+		
A+Fm+RW1+Rh		+	+	+	+	
A+Fm+RW1+Rh+ μ f		+	+	+	+	+

2.2. Arbuscular mycorrhizal root colonization

Arbuscular mycorrhizal root colonization was visualized after 24 weeks of culture by microscopic observation (Olympus BX40F, Japan). Fresh roots were sampled and stained with trypan blue according to the method reported in Mustapha et al. (2016). The root colonization rate was calculated using the grid line intersect method (McGonigle et al., 1990). One hundred thirty-five root fragments from three different pots were observed under an optical microscope (\times 100 magnification). Three intersections per root fragment were examined. In total, 400 observations per treatment were analyzed to estimate the total, arbuscular and vesicular mycorrhizal rates.

2.3. Determination of plant growth

After 24 weeks of culture, alfalfa roots and shoots were collected to estimate the plant growth under various conditions. Roots and shoots were rinsed with sterile water, lyophilized during 48 hours and weighed to determine their dry weights. 30 plants were used as biological replicates per treatment.

2.4. Estimation of pigments content

Chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids were extracted from 25 mg of frozen leaves at -80°C according to the method reported in Magnin-Robert et al. (2011). The concentrations of pigments spectrophotometrically according to the absorbance coefficients determined by Lichtenthaler (1987). Results were expressed in micrograms of pigments per milligrams FW.

2.5. Dioxins/furans extraction

The determination of PCDD/F refers to EPA Method 8290. 10 g of lyophilized soil and crushed to 2 mm were taken. The extractions were performed with toluene using a commercial service provided

by ASE Mode (Accelerated Solvent Extraction), under 50°C and 103 bars. The levels of seventeen congeners of PCDD/F are determined by gas chromatography equipped with a high-resolution mass spectrometry detector (GC / HRMS). The results provide the concentrations of the compounds analyzed in ng/kg of soil and the total toxic equivalents (TEQ). The TEQ values were calculated using measured PCDD/F concentrations and Toxic Equivalency Factors (TEFs WHO-05). A TEQ is calculated by multiplying the concentration of PCDD/F by its corresponding TEF. Three replicats for each treatment were analyzed.

2.6. Soil enzymes assays

2.6.1. Soil dehydrogenase (HDA) activity

The measure of rhizosphere dehydrogenase activity was based on the determination of triphenyl formazan formed from the reduction of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) in the soil according to a modified Tabatabai method (1982). Three replicate samples of 6 g moist soil were mixed with 0.06 g CaCO₃, 1 ml of a 3 % (w/v) TTC and 2.5 ml distilled water. After 24 h of incubation at 37°C, 10 ml of methanol was added. The tubes were then incubated for 1 h under horizontal agitation (200 rpm). This last step was repeated 3 times. After centrifugation at 2000 rpm for 5 min, absorbance of the supernatant was read spectrophotometrically at 485 nm. Dehydrogenase activities in the samples were calculated by using calibration graphs. Results are presented as µg/g of soil/24 h.

2.6.2. Soil Fluorescein Diacetate (FDA) hydrolase

One g of moist soil was added to 7.5 ml of 60 mM phosphate buffer, 100 µl of a 1M fluorescein diacetate substrate (Sigma-Aldrich) according to the modified Adam and Duncan method (2001). After incubation at 30° C with agitation (50 rpm) for 1 hour, the reaction was stopped by adding 1 ml of acetone to 1 ml of supernatant. After centrifugation (10000 rpm), 200 µl of supernatant were deposited in a 96-well microplate. The fluorescence of the product (fluorescein) was readed using a spectrofluorimeter (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific) (emission 523 nm, excitation 494 nm). The standard range was carried out using fluorescein solution (Sigma-Aldrich) at 100 µg/ml. Results are presented as µg/g of soil.

2.7. Cytotoxicity tests

The evaluation of the overall cytotoxicity of soil before and after the phytoremediation consisted of exposing two cell lines to organic extracts of 160 g of contaminated soil by PCDD/F before and after treatment (Fm+RW1+Rh+µf) by using toluene as an extraction solvent. The cell lines used are: (1) BEAS-2B lung cells originally derived from normal bronchial epithelial human cells (European

Collection Authenticated Cell Cultures ECACC, Wiltshire, UK; reference: 95102433), and (2) HepG2 hepatic cells derived from hepatocellular carcinoma human cells (American Type Culture Collection Company). After 48 h of exposure of 200 ml of PCDD/F extract, the possible toxicity was evaluated by means of two complementary enzymatic activities on the both cell lines. The lactate dehydrogenase (LDH) makes it possible to demonstrate the increase of the membrane permeability via the determination of the cytosolic enzyme which could be released in the cell culture medium after alteration of the membrane (Cytotoxicity Detection Kit LDH, Roche Diagnostics), and the mitochondrial dehydrogenase (MDH) is used to measure mitochondrial metabolic activity (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics). Cytotoxicity tests were performed in 96-well culture microplates with 2×10^4 cells/200 μ l per well. In addition to the various conditions tested, eight replicates corresponding to the control (unexposed cells) and eight wells corresponding to the positive control (100% of cell death) to which Triton X -100 (2% v/v), were added before performing the assay on the same day. Results are presented by the decrease percentage of LDH and increase percentage of MDH versus control soil before phytoremediation.

2.8. Soil DNA extraction and DNA quantification

From 250 mg of soil genomic DNA was isolated using the NucleoSpin® Soil DNA isolation kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), according to manufacturer instructions. The DNA quality from different samples were resolved by gel electrophoresis on 1% (w/v) agarose gels, and images of gels stained with Ethidium bromide (Molecular Probes, Eugene, USA) were captured with Gel Doc (BioRad, USA). All DNA extracts were diluted to 0.5 ng/ μ L for subsequent analyses. The Extracted DNA concentration was quantified with Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). DNA concentrations were carried out according to the protocol with High Sensitivity Quant-iT™ kit (Molecular Probes, Invitrogen, Paisley, UK). The fluorescence was measured under a StepOne™ Real-Time PCR System (excitation 485 nm, emission 517 nm). From the data produced, a standard curve was plotted in Sigma Plot and the concentration of all samples calculated.

2.9. PCR and Amplicon sequencing

PCR amplification of 16S rDNA of Bacteria and Archaea were performed using respectively primer pairs 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'), ARCH517F (5'-GCYTAAAGSRNCCGTAGC-3') and ARCH909R (5'-TTTCAGYCTTGCGRCCGTAC-3'), and fungal ITS regions was performed by using ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) and 58A2R (5'-CTGCGTTCTTCATCGAT-3'). PCR

reactions were achieved in a volume of 25 µl containing 0.2 mM of dNTP, 0.6 µM of each primer, 1,25 µl of DMSO, 1 ng of DNA and 0.5U of *Taq* DNA polymerase (Roche, Mississauga, ON). PCR were run in a thermocycler using the following parameters: initial denaturation at 94°C for 2 min, 30 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 30 sec and a final elongation at 72°C for 7 min. PCR reaction, Barcode multiplexing and Illumina MiSeq were performed at the Genome Quebec Innovation Center at McGill University (Montreal, QC).

2.10. Bioinformatic analysis

The Illumina datasets were processed as described in Brazilian Microbiome Project (<http://www.brmicrobiome.org/16s-profiling-pipeline-illumina>) with some modifications. The partial 16S rRNA gene and ITS sequences were processed in Mothur (v.1.34.4) (Schloss et al., 2009) and QIIME (v.1.9.1) (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et al., 2010). The first part of the pipeline was performed in mother, it is composed of five steps: i) forward and reverse sequences reads were merged within the *make.contigs* command, ii) trim off primers with *trim.seqs* command, and iii) *trim.seqs* command was used for remove singletons, iv) finally, merged file was separated into individual files for use in QIIME. The next part was performed in QIIME. Sequences were chimera checked against the gold.fa database (<http://drive5.com/uchime/gold.fa>) and clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) according to their sequence similarity (97%) using the USEARCH v8.1. Reads were first clustered against the Greengenes_13_8 16S rRNA gene database for bacteria and archaea) and the HMM ITS rRNA gene database for fungi. Taxonomy was assigned to the representative sequence of each OTU using uclust with the Green genes 16S rRNA gene database and HMM ITS rRNA gene database. Datasets were randomly standardized by subsampling to the sample size that showed the lowest number of reads. The Relative abundances were calculated with Excel on the different datasets to visualize the percentage of the taxonomic affiliations across AMF inoculation and plant species. All Illumina MiSeq databases generated in this study were deposited in the NCBI Sequence Read Archive and are available under the project number (..)

2.11. Statistical analysis

Data were analyzed statistically by means of comparison by the ANOVA one-way, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests using, XLSTAT 19.1. Different letters following values indicate statistically significant differences between various treatments. Data of colonization rates were converted to

arcsine values before ANOVA one-way test. Standard deviations were calculated by Microsoft Office Excel 2007 for all data.

3. Results

3.1. Mycorrhizal root colonization and roots growth of alfalfa in response to different treatments

Whereas no AMF structures were observed in the absence of inoculation, mycorrhizal hyphae, arbuscules and vesicles were clearly observed in roots of alfalfa inoculated with *Funneliformis mosseae*. Total mycorrhizal rates ranged from 27 to 47%, vesicles from 19.6 to 31% and arbuscules from 7 to 12% (Fig. 1). The lower total mycorrhizal and vesicular colonization were observed in roots of plants inoculated with Fm+RW1+Rh+ μ f, while the higher total mycorrhizal, arbuscular and vesicular colonization were obtained in roots only inoculated with Fm (A+Fm). This difference was statistically significant (Fig. 1).

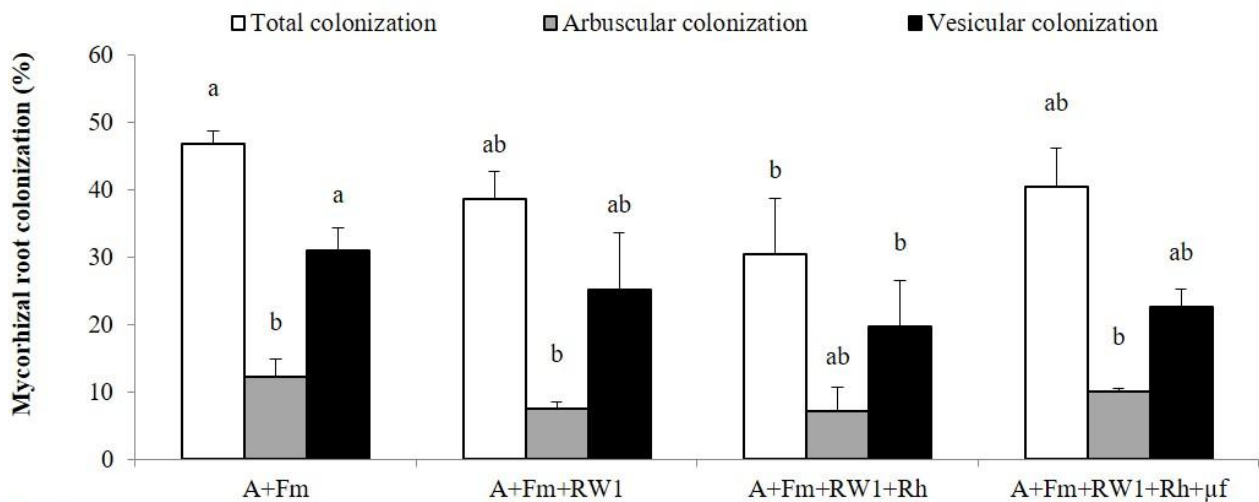


Fig. 1. Total, arbuscular and vesicular mycorrhizal colonization of alfalfa in response to different treatments. Treatments consisted of non-inoculated alfalfa (A), combined with *Funneliformis mosseae* (A+Fm), plus *S. witichii* RW1 (A+Fm+RW1), plus rhamnolipids Rh (A+Fm+RW1+Rh), plus microflora μ f (A+Fm+RW1+Rh+ μ f) grown in microcosms for 24 weeks on the aged polluted soil. Different letters indicate significant differences between treatments according to the ANOVA one-way test ($P \leq 0.05$). Values are means \pm s.d. (n=6).

In parallel to the mycorrhizal rates, significant difference of the roots dry weight were observed between these two treatments, with an higher roots weight of alfalfa treated with Fm alone (higher total and vesicular rates) than with A+Fm+RW1+Rh (lower total and vesicular rates) (Fig. 2B). Nevertheless, no significant effect was observed on alfalfa root adding with various treatments used.

In details, the means of root dry weight in different treatments varied from 37 to 75 mg/plant (Fig. 2B).

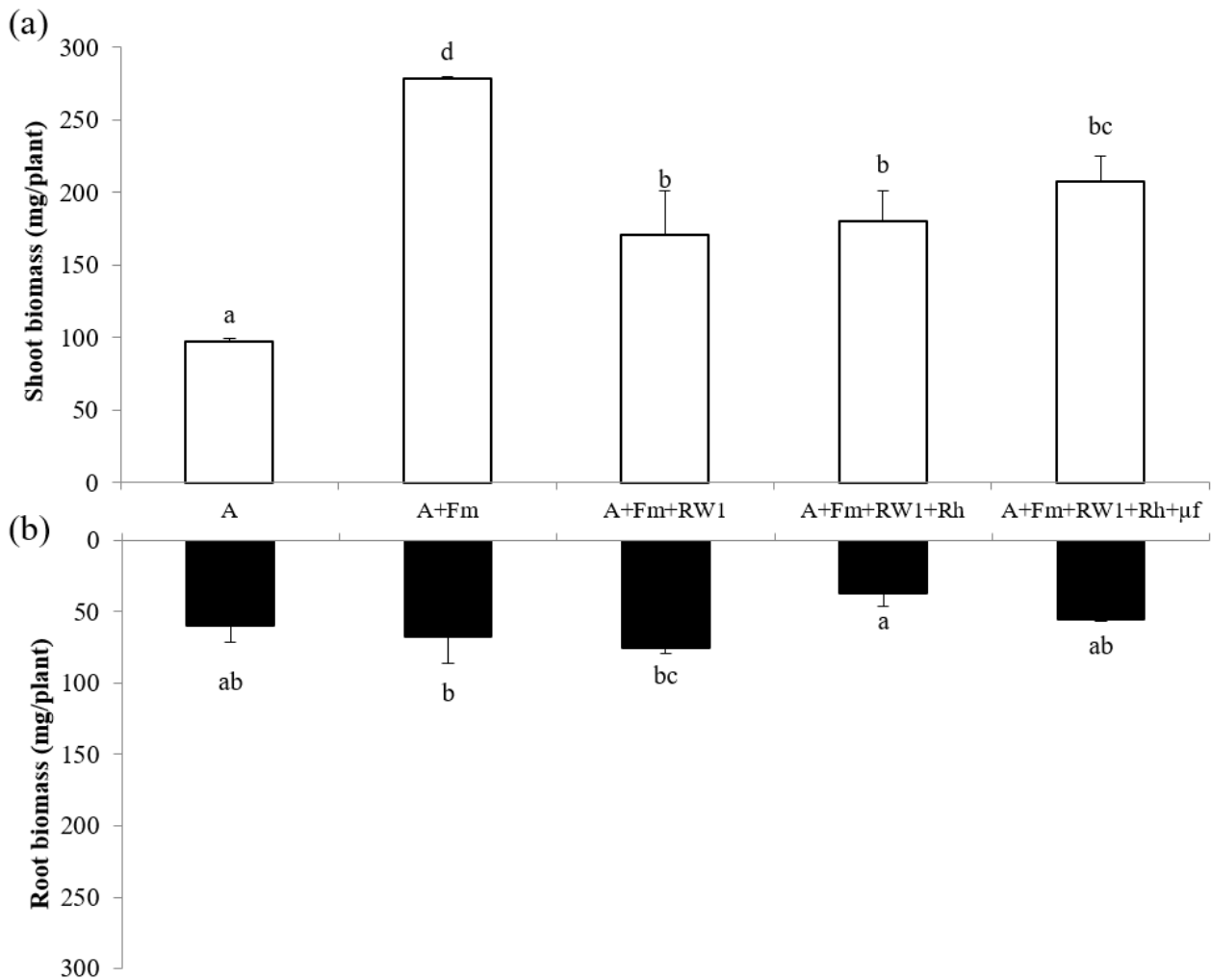


Fig.2. Shoots (A) and roots (B) biomass dry weight of alfalfa (A), combined with *Funneliformis mosseae* (A+Fm), plus *S. witichii* RW1 (A+Fm+RW1), plus rhamnolipids Rh (A+Fm+RW1+Rh), plus microflora μ f (A+Fm+RW1+Rh+ μ f) grown in microcosms for 24 weeks on the aged polluted soil. Different letters indicate significant differences between treatments according to the ANOVA one-way test ($P \leq 0.05$). Values are means \pm s.d. (n=5).

3.2. Shoot growth and photosynthetic pigment content of alfalfa in response to different treatments

The shoot dry weight of alfalfa cultivated on the aged PCDD/F polluted soil attained 97 mg/plant after 24 weeks. Significant improvements of the shoot weight were observed with all of the treatments, by 1.8-fold with A+Fm+RW1, 1.9- with A+Fm+RW1+Rh, 2.1-fold with

A+Fm+RW1+Rh+ μ f and 2.9-fold with A+Fm (Fig. 2A). In parallel to the shoot dry weight, the photosynthetic pigments content in the leaves of alfalfa grown on aged-PCDD/F polluted soil was estimated and attained approximately 1.5 μ g/mg for each pigment (A condition) (Fig. 3). All of the treatments induced significant increases of the three pigment contents except for chlorophyll b in A+Fm and A+Fm+RW1 treatments. The higher contents of photosynthetic pigments was observed in the leaves of alfalfa cultivated in the aged-PCDD/F polluted soil with Fm+RW1+Rh+ μ f. In details, for chlorophyll a, significant increases of 2.1, 8.2, 9.7 and 10.4 times were observed in A+Fm, A+Fm+RW1+Rh, A+Fm+RW1 and A+Fm+RW1+Rh+ μ f respectively. For chlorophyll b, significant increases of 5.4 and 7.3 times were observed in A+Fm+RW1+Rh and A+Fm+RW1+Rh+ μ f respectively. For carotenoids, significant increases of 4.7, 5.8, 6.9 and 8.6 times were observed in A+Fm+RW1+Rh, A+Fm+RW1+Rh+ μ f, A+Fm and A+Fm+RW1 respectively.

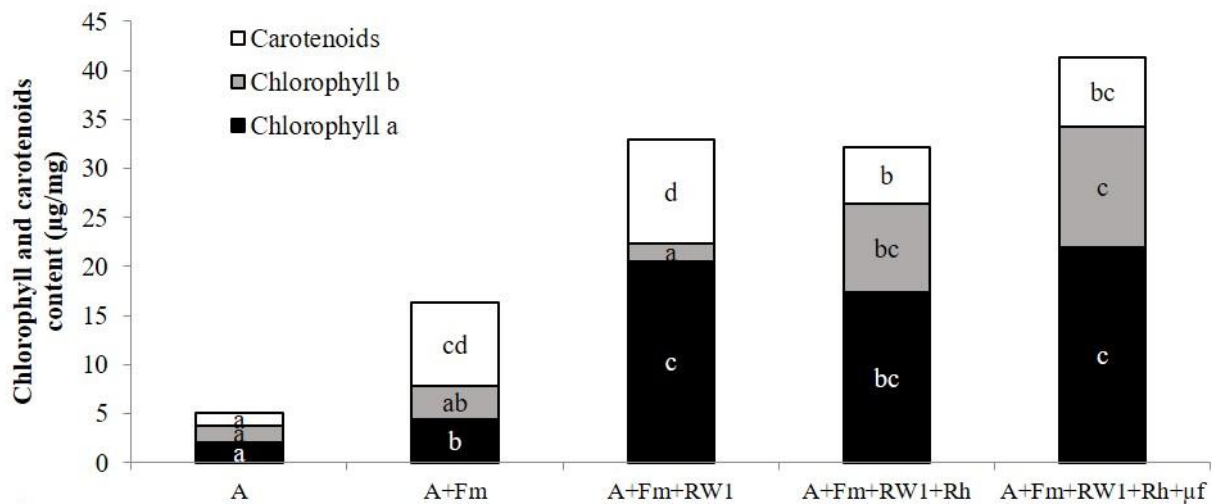


Fig.3. Chlorophyll a and b and carotenoids content in leaves of non-inoculated alfalfa (A), combined with *Funneliformis mosseae* (A+Fm), plus *S. witichii* RW1 (A+Fm+RW1), plus rhamnolipids Rh (A+Fm+RW1+Rh), plus microflora μ f (A+Fm+RW1+Rh+ μ f) grown in microcosms for 24 weeks on the aged polluted soil. Different letters indicate significant differences between treatments according to the Kruskal-Wallis test ($P \leq 0.05$). Values are means \pm s.d. (n=5).

3.3. Assessment of soil microbial activity in response to various treatments

The soil microbial activity estimated with DHA and FDA activities in non-planted soil was about 65 μ g/g of soil/24h and 5 μ g/g respectively (Table 2). In planted soil with alfalfa (A) significant increases of 3 and 3.4 times were observed with DHA and FDA activities respectively, compared to non-planted soil. For DHA activity, no significant differences were observed in planted soil with different treatments compared to planted soil with alfalfa (A). The higher FDA activity was observed in the soil planted with alfalfa and treated with Fm+RW1+Rh about 70 μ g/g (4.1-fold higher

than the A condition). In addition, FDA activity was also higher in alfalfa-planted soil treated with Fm (A+Fm) and with Fm+RW1 (A+Fm+RW1), 3- and 3.2-fold compared to A, respectively.

Table 2 Dehydrogenases and Fluorescein diacetate hydrolase activities in polluted soil of different treatments.

Treatments consisted of non-inoculated alfalfa (A), combined with *Funneliformis mosseae* (A+Fm), plus *S. witichii* RW1 (A+Fm+RW1), plus rhamnolipids Rh (A+Fm+RW1+Rh), plus microflora μ f (A+Fm+RW1+Rh+ μ f) grown in microcosms for 24 weeks. Different letters indicate significant differences between treatments according to the Kruskal-Wallis test ($P \leq 0.05$). Values are means+s.d. (n=4).

Samples	Dehydrogenase (DHA) (μg/g of soil/24h)	Fluorescein diacetate (FDA) hydrolase (μg/g of soil)
Non-planted	65 \pm 3a	5 \pm 0,1a
A	196 \pm 28bcd	17 \pm 6b
A+Fm	288 \pm 94cd	51 \pm 10c
A+Fm+RW1	186 \pm 36bc	55 \pm 7c
A+Fm+RW1+Rh	173 \pm 22b	25 \pm 4b
A+Fm+RW1+Rh+μf	281 \pm 31d	70 \pm 7d

3.5. Soil PCDD/F dissipation in response to different treatments

After 24 weeks of culture, PCDD/F dissipation was about 12 ng/kg in non-planted soil. Only the A+Fm+RW1+Rh+ μ f condition showed significant difference compared to planted soil with alfalfa (A). Total PCDD/F dissipation in A+Fm+RW1+Rh+ μ f was 3 and 6 times higher than in planted (A) and non-planted soil respectively. In this condition, PCDD/F dissipation was estimated to 23% compared to non-planted soil. The PCDD/F accumulation in shoots and roots were estimated respectively to 0.09 and 0.45% in the A+Fm+RW1+Rh+ μ f condition (Fig 5). In details, the PCDD/F congeners accumulated in roots, four congeners were detected, the 1234678 Heptachlorodibenzofuran (HepCDF), Octachlorodibenzodioxin (OCDD), Octachlorodibenzofuran (OCDF), 1234678 Heptachlorodibenzodioxin (HepCDD) and 1234789 Heptachlorodibenzofuran (HepCDF). In shoot, the 1234678 Heptachlorodibenzofuran (HepCDF) the 123789 Hexachlorodibenzofuran (HxCDF) and the 123478 Hexachlorodibenzodioxin (HxCDD) was also identified (data not shown). PCDD/F dissipation in the soil concerned in particular: Octachlorodibenzodioxin (OCDD), 1234678-Heptachlorodibenzodioxin (HepCDD), Octachlorodibenzofuran (OCDF) and 1234678 Heptachlorodibenzofuran (HepCDF) (Fig 4). While TEQ PCDD/F in the soil was observed in A+Fm (19.6%), A+Fm+RW1 (18%) and A+Fm+RW1+Rh+ μ f (21.3%) compared to non-planted soil, the plantation with alfalfa did not show significant difference of the toxicity in the soil compared to non-planted soil.

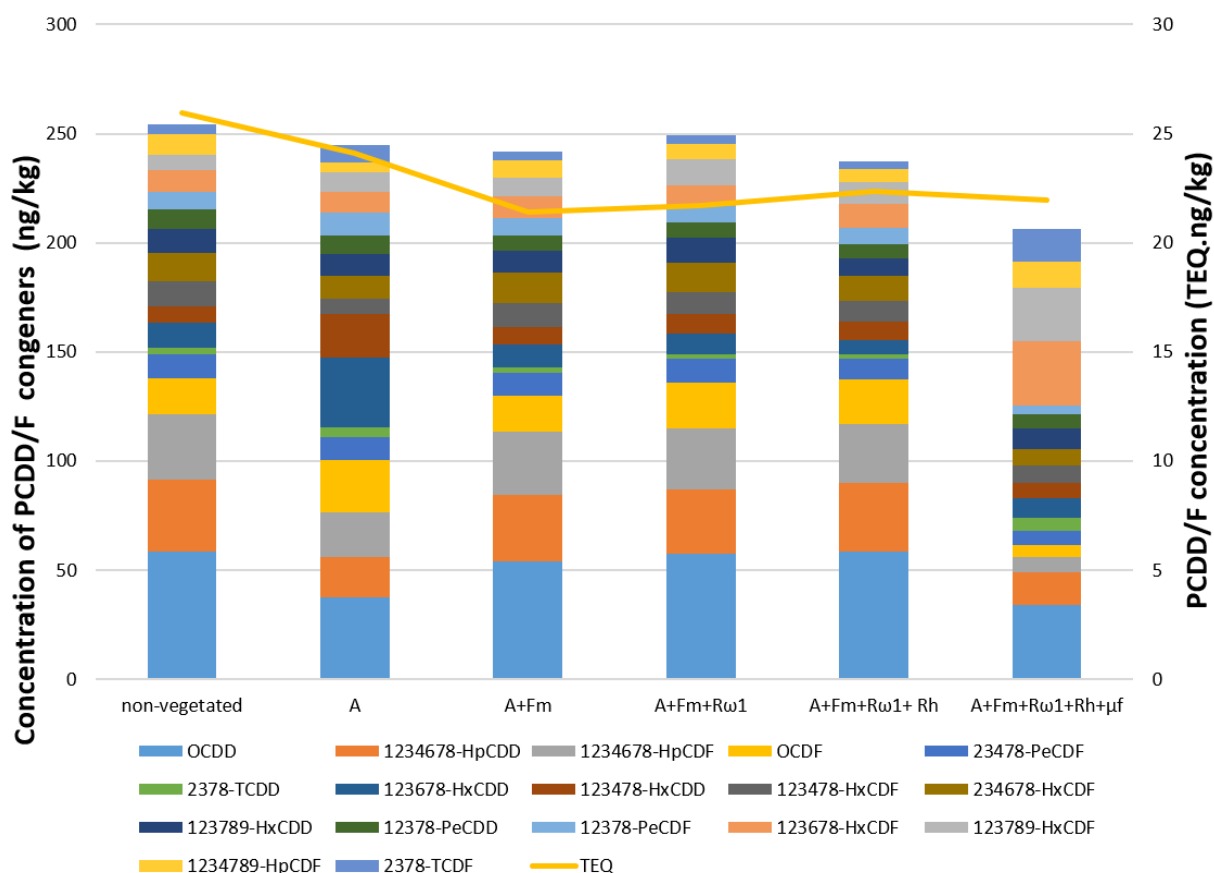


Fig. 4. PCDD/F dissipation and residual PCDD/F congeners concentrations in the polluted soil (ng. TEQ/kg) for the different treatments. Treatments consisted of non-inoculated alfalfa (A), combined with *Funneliformis mosseae* (A+Fm), plus *S. witichii* RW1 (A+Fm+RW1), plus rhamnolipids Rh (A+Fm+RW1+Rh), plus microflora µf (A+Fm+RW1+Rh+µf) grown in microcosms for 24 weeks. Different letters indicate significant differences between treatments according to the Kruskal-Wallis test ($P \leq 0.05$). Values are means±s.d. (n=3).

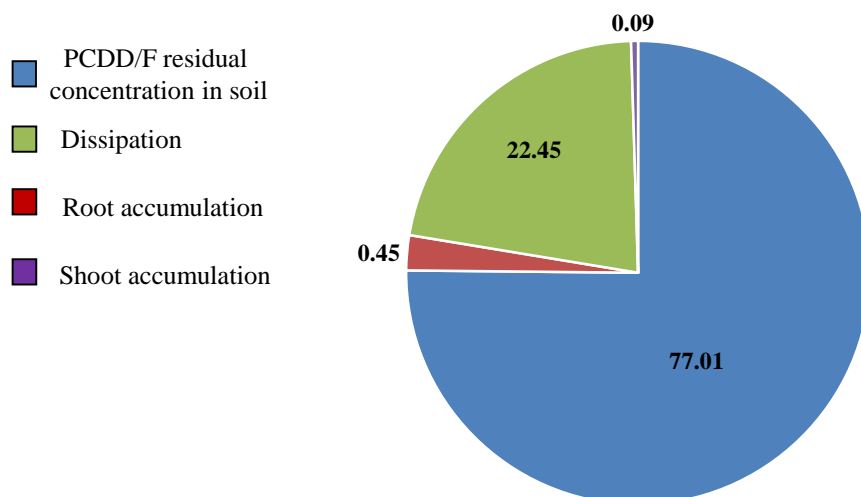


Fig. 5. Repartition (%) of PCDD/F in the A+Fm+RW1+Rh+µf condition after 24 weeks of culture in microcosms.

3.6. Estimation of the cytotoxicity of polluted soil after A+Fm+RW1+Rh+µf treatment

The LDH makes it possible to demonstrate the increase of the membrane permeability via the determination of the cytosolic enzyme which could be released in the cell culture medium after alteration of the membrane, and the MDH is used to measure mitochondrial metabolic activity. In lung cells (Beas2B), LDH activity decreased significantly ($P < 0.0001$) by 44% compared to control soil before phytoremediation, which means a decrease in soil cytotoxicity. However, no significant difference on MDH activity was observed. In liver cells (HepG2), MDH activity increased significantly ($P < 0.0001$) by 18% compared to control soil before phytoremediation which means a decrease in soil cytotoxicity, and LDH activity decreased significantly ($P = 0.0001$) by 5% (Table 3). These results clearly showed that the cytotoxicity of soil after phytoremediation measured with MDH and LDH activities was lower compared to the soil before phytoremediation.

Table 3 Decreased activity lactate dehydrogenase (LDH) and increased mitochondrial activity (MDH) lung and liver cells in the soil planted with alfalfa and combined with with Fm, RW1, Rh and µf compared to soil samples before phytoremediation. *P* value bolded indicate significant differences between A+Fm+RW1+Rh+µf condition and control soil before phytoremediation according to the Mann-Whitney test ($P \leq 0.05$). Values are means+s.d. (n=12).

Cells	Enzymes	A+Fm+RW1+Rh+µf (%)
Lung Cells (Beas2B)	LDH activity vs control	44±24 ($P < 0.0001$)
	MDH activity vs control	5±1 ($P = 0.751$)
Liver Cells (HepG2)	LDH activity vs control	5±1 ($P = 0.0001$)
	MDH activity vs control	18±9 ($P < 0.0001$)

3.7. Soil microbial community structure

The mean OTUs observed within non-planted soil were 481, 9 and 621 in bacterial, archaeal and fungal communities, respectively. In the A+Fm+RW1+Rh+µf planted microcosms, mean OTUs increased significantly only for bacteria by 29% (Table 4). Bacterial and fungal richness (Chao1 estimator) were significantly higher for the planted soil compared to non-planted soil. The diversity (Shannon index) for bacterial, archaeal and fungal communities were estimated within non-planted soil, at 7.1, 0.9 and 1.9, respectively. Only the bacterial diversity appeared to be influenced by the treatment A+Fm+RW1+Rh+µf compared to non-planted one (Table 4).

Table 4 Alpha diversity metrics for rhizosphere samples collected from non-planted polluted soil and in inoculated alfalfa with Fm plus RW1 plus Rh plus µf (A+Fm+RW1+Rh+µf) grown in microcosms for 24 weeks. Values represent mean ± SD. Different letters indicate significant differences between A+Fm+RW1+Rh+µf and non-planted soil according to Tukey (HSD) test on observed OTUs, Chao1 richness estimate and Shannon diversity indices on the community structures of Bacteria, Archaea and Fungi. Values are significant at $P < 0.05$.

		Observed OTUs	Chao1 richness estimate	Shannon diversity index
Bacteria	Non-planted	481 ± 23a	488 ± 34a	7.1 ± 0.14a
	A+Fm+RW1+Rh+µf	618 ± 57b	657 ± 51b	7.5 ± 0.13b
Archaea	Non-planted	9 ± 1a	8 ± 1a	0.9 ± 0.42a
	A+Fm+RW1+Rh+µf	7 ± 2a	7 ± 1a	1.3 ± 0.05a
Fungi	Non-planted	621 ± 79a	738 ± 209a	1.96±0.8a
	A+Fm+RW1+Rh+µf	563 ± 145a	1176 ± 160b	2.21± 0.27a

After 24 weeks of culture, the two samples showed similarities in bacterial community composition at the class level. The non-planted soil was dominated by members of Alphaproteobacteria, Bacilli, Betaproteobacterie, Gammaproteobacteria, Actinobacteria and Saprospirae classes with 24.7, 15.6, 8.4, 7.4, 6.5 and 6% respectively (Fig 6a). While the abundance of Acidimicrobiia, Actinobacteria, Chloroflexi, Deltaproteobacteria, Plactomycetia and Solibacteres appeared to increase significantly in A+Fm+RW1+Rh+µf planted soil compared to non-planted one, the abundance of Bacilli decrease. No differences of the abundances were detected for Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gemmatimonadetes and Saporospirae between the both treatments.

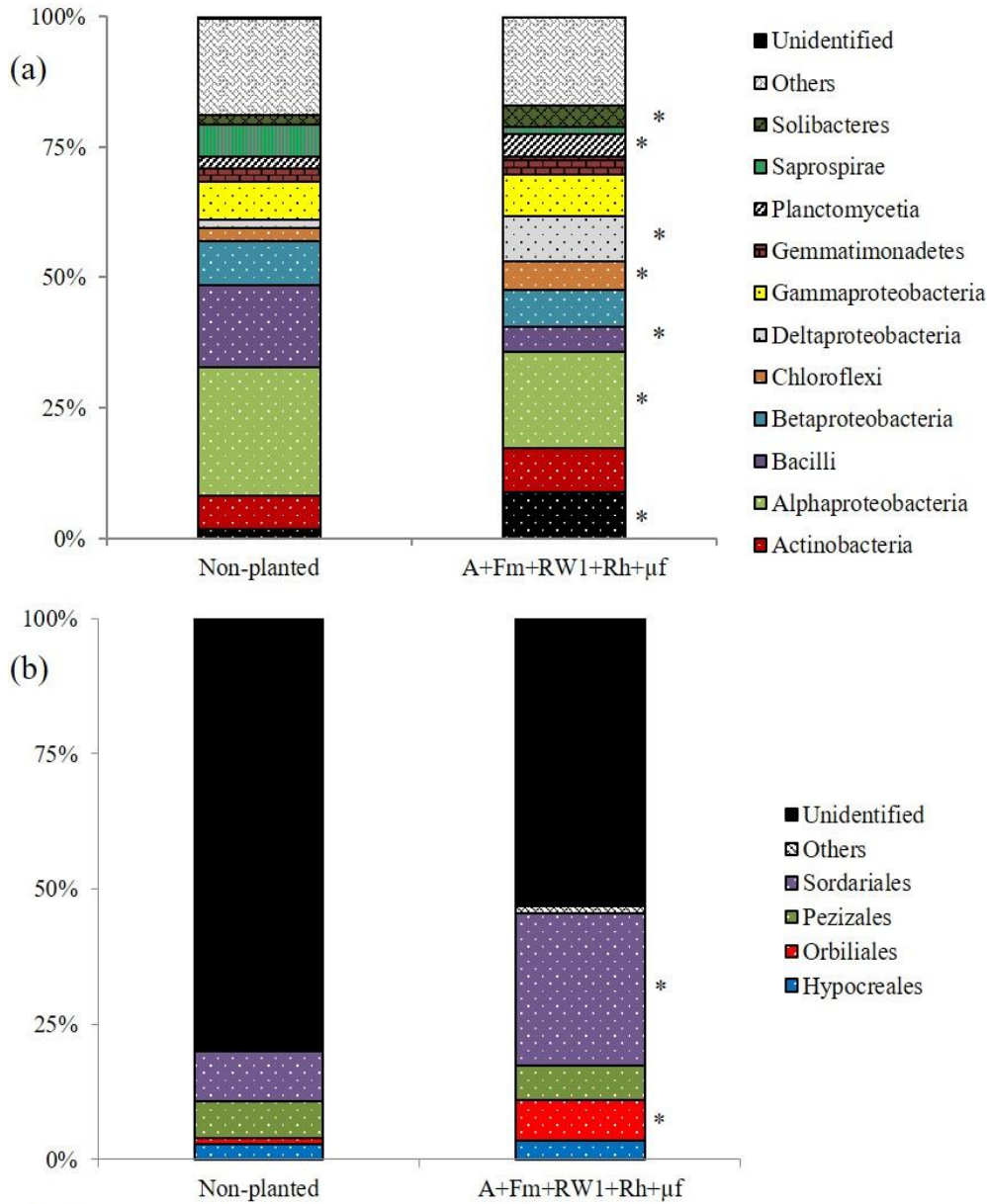


Fig. 6. Relative abundances of major (A) bacterial Classes of 16S rRNA gene dataset and (B) orders of fungal ITS dataset. (*) indicate significant differences between different bacterial classes and fungal orders on non-planted soil and A+Fm+RW1+Rh+µf condition according to the Tukey (HSD) test ($P \leq 0.05$).

For fungal community (Fig 6b), all samples showed similar composition at the order level. The non-planted soil was dominated by members of the orders Pezizales and Sordariales with 6.9 and 9.2% respectively. The abundance of Sordariales and Ordiliales increased significantly in the A+Fm+RW1+Rh+µf condition compared to the non-planted soil and reached a percentage of 207 and 636%, respectively

4. Discussion

In order to optimize PCDD/F dissipation of an aged contaminated soil, an experiment of phytoremediation using alfalfa assisted with a combination of several biological amendments (mycorrhizal inoculum, rhamnolipids, the dioxin-degrading *S. wittichii* RW1 and the native microflora) was carried out in a microcosm. In addition, the current study aims at a better understanding of the impact of assisted phytoremediation on the soil microbial community structure and of the microbiome rhizosphere role in PCDD/F dissipation.

Our results showed that the addition of the mycorrhizal inoculum, rhamnolipids, native microflora and *S. wittichii* RW1 in the aged PCDD/F-polluted soil has a positive effect on alfalfa aerial biomass and chlorophyll content. Indeed, these amendments are known to increase the plant nutrition. These results are in agreement with many previous studies which showed that AMF increase plant biomass and chlorophyll content in contaminated soils by improving mineral uptake of P, Mn, K, Cu, and Fe (Wu et al., 2011; Yu et al., 2011; Nwoko, 2014). Thus, the introduction of rhamnolipids in PAH-polluted soil increased the permeability of ryegrass root cells, which may also increase the nutrient uptake (Zhu and Zhang, 2008). Moreover, the production of indole-3-acetic acid by *Sphingomonas* can also explain the enhance of plant growth (Tsavkelova et al., 2007), this compound also produced by plants, is the most common plant hormone of auxin class, which induces cell elongation and cell division (Perrot-Rechenmann, 2010). The higher plant growth under the amended conditions can also be explained by a decrease in soil phytotoxicity. Indeed a PCDD-induced toxicity was demonstrated in *Arabidopsis* by a decrease in seed germination, a loss in fresh weight with a striking decrease in chlorophyll content (Hanano et al., 2014). Our results showed also that the cytotoxicity of soil after phytoremediation measured with MDH and LDH activities were lower compared to the soil before phytoremediation. Generally, the soil toxicity diminishes with the decrease of TEQ PCDD/F concentrations (Urbaniak et al., 2017). In this study, the residual TEQ PCDD/F concentrations decreased when soil was planted in presence of various amendments (A+Fm; A+Fm+RW1, A+Fm+RW1+Rh, A+Fm+RW1+Rh+ μ f). This lower phytotoxicity and cytotoxicity could be explained by the decrease of highly toxic PCDD/F congeners in soil. Each congener is assigned a specific toxic equivalency factor (TEF) that reflects its potency to produce a toxicological effect compared with the most potent congener, 2378-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). The PCDD/F congeners dissipated in the soil concerns in particular 12378-PeCDD (TEF=1), 123478-HxCDF (TEF=0.1) and 2378-TCDD (TEF=0.3) and this PCDD/F dissipation induced a 12 % decrease of the total TEQ PCDD/F concentrations in amended conditions. This decrease of soil toxicity was not necessarily correlated with the high decrease of PCDD/F contents in soil. Indeed, only the A+Fm+RW1+Rh+ μ f condition showed a significant reduction of total PCDD/F concentration

estimated to 23% where OCDD, 1234678-HepCDD, 1234678-HepCDF and OCDF were particularly dissipated.

Chlorinated organic compounds (eg PCDD/F, PCBs) are highly hydrophobic and tend to strongly adsorb onto soil organic matters, thus becoming poorly available in soil/water phase where degrading-microorganisms are generally located (Providenti et al., 1993; Grant et al., 2011). This rate of dissipation can be explained by the PCDD/F bioavailability increase resulting from the spiking of the aged-contaminated soil with a PCDD/F organic extract at the start of the experiment. This result could also be assigned to the synergic effect of the supplemented amendments (mycorrhizal inoculum, rhamnolipids, the dioxin-degrading bacteria *S. wittichii* RW1 and the native microflora). Manickan et al. (2012) found that the rhamnolipids offered highest solubilization and enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane isomers by *Sphingomonas sp* in soil after 30 days of culture. AMF played also an important role in survival and plant growth by improving pollutant tolerance and nutrient uptake (Zhou et al., 2013). Moreover, it also could enhance chlorinate compounds dissipation through increasing the number of degrading-microorganisms in the mycorrhizosphere (Teng et al., 2010; Zhang et al., 2010). In this work, the degrading-microbial consortia corresponded to the reintroduced native microflora (Rh) from the aged-contaminated soil and *S. wittichii* RW1, a bacteria of great interest in the bioremediation of polluted soils for its ability to biotransform a large number of toxic polychlorinated dioxins (Halden et al., 1999; Nam et al., 2006). These microorganisms in the rhizosphere act probably in tandem to effectively enhance the PCDD/F breakdown (Macek et al., 2000; Chaudhry et al., 2005; Kuiper et al., 2004; Yateem et al., 2007). We detected a negligible amount of PCDD/F in alfalfa shoot biomass in comparison with the amount removed (48 ng/kg soil), suggesting that the absorption by plant contributed minimally to PCDD/F removal. Indeed, various studies showed that PCDD/F are not transported to plant roots and then transferred into aboveground plant tissue because of their hydrophobicity (Zhang et al., 2009). Therefore, we presume that the enhanced PCDD/F removal in A+Fm+RW1+Rh+ μ f condition resulted from the stimulation of soil microbial activity. In fact, DHA and FDA soil microbial activities were significantly higher in planted soil compared to non-planted soils. Similar results were also described by Tu et al (2011) who showed that alfalfa increased significantly both DHA and FDA activities in PCB polluted soil compared to the unplanted soil after 2-year remediation. The stimulation of FDA and DHA activities could be also explained by the increase of microbial diversity and richness. The mean of bacterial OTUs, richness (Chao 1 estimator) and diversity (Shannon index) increased significantly in Fm+RW1+Rh+ μ f condition while no significant modulations were observed in archaeal community. A slight shift has also been observed for the fungal community, which corresponds to an increase of fungal richness in Fm+RW1+Rh+ μ f

condition. The bioremediation of PCDD/F-contaminated soil requires diverse microbial degradation processes involving the activity of specialized microbial communities. It was suggested that PCDD/F degradation began by an initial dechlorination process to free several chlorine-substituted positions downstream for the hydroxylation and cleavage of aromatic rings (Kaiya et al., 2012). Reductive dehalogenation and oxidative degradation, mediated by specific anaerobic and aerobic microbial populations, respectively, have been proposed as mechanisms involved in the transformation of PCDD/Fs (Hiraishi, 2008). Therefore, to identify the potential microbial groups associated to PCDD/F degradation in the aged contaminated soil, the amplicon sequencing data were examined. So far, numerous bacterial genera under the phyla Actinobacteria, Proteobacteria, and Firmicutes with various ring-hydroxylating dioxygenases have been reported to degrade PCDD/Fs aerobically in pure cultures (Chen et al., 2013); whereas only members of the genus *Dehalococcoides* and their relatives under the phylum *Chloroflexi* were known to dechlorinate the PCDD/F under obligate anaerobic conditions (Bunge et al., 2003). PCDD/F degradation has also been characterized in fungi, where several oxidative mechanisms are responsible for PCDD/F degradation and employ cytochrome P-450, lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase (Chang, 2008). A large number of white rot fungi such as *Phanerochaete chrysosporium* were assessed as potential dioxin degraders (Covino et al., 2016), however PCDD/F degradation by non-ligninolytic fungi such as *Cordyceps sinensis* (Sordariomycetes order) has already been highlighted (Nakamiya et al., 2005). Our results showed that the abundance of Acidimicrobiia, Actinobacteria, Chloroflexi, Deltaproteobacteria, Plactomycetia and Solibacteres increased significantly in Fm+RW1+Rh+ μ f condition compared to non-planted one. Similarly fungal abundance such as Orbiliales and Sordariales were higher in planted soil with alfalfa with various amendments (Fm+RW1+Rh+ μ f) compared to non-planted soil. Therefore, the amplicon sequencing analysis detected several orders or classes known to be involved in PCDD/F degradation such as Actinobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi in bacteria or Sordariales in fungi. Our results suggested that alfalfa in association with the different biological amendments have quantitative and qualitative effects on shaping soil microbial community and could modify the PCDD/F dissipation processes consequently.

Conclusion

Our study demonstrated that the phytoremediation of aged PCDD/F-contaminated soil was improved using the combined effect of arbuscular mycorrhizal inoculation, the rhamnolipids amendment, the introduction PCDD/F degrading-bacteria *S. wittichii* RW1 and the reintroduction of native microflora which probably possess the genetic resources associated with the degradation of PCDD/F. Furthermore, in the combined condition, alfalfa rhizosphere soil contained a higher microbial activity

compared to the non-planted soil and specific microbial population known to be able to degrade PCDD/F. The combined use of these various amendments may have some potential as a biotechnological approach for the decontamination of soils contaminated with PCDD/F and the reduction of their toxicity. Thus, well-designed, large-scale and long-term field trials will be essential to evaluate the feasibility on the approach proposed in this article. The economics of these new remediation processes should be assessed against other options.

Acknowledgments

Experiments presented in this paper were carried out using the CALCULCO computing platform, supported by SCoSI/ULCO (Service COMMun du Système d'Information de l'Université du Littoral Côte d'Opale).

References

- G. Adam, H. Duncan, Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33 (2001) 943–951.
- P. Bharali, S. Das, B.K. Konwar, A.J. Thakur, Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65 (2011) 682–690.
- P. Binet, J.M. Portal, C. Leyval, Dissipation of 3-6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biol. Biochem.* 32 (2000) 2011–2017.
- M. Bunge, L. Adrian, A. Kraus, M. Opel, W.G. Lorenz, J.R. Andreesen, H. Görisch, U. Lechner Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. *Nature* 42 (2003) 1357–360.
- J.G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh, et al 2010. QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335–336. doi:10.1038/nmeth.f.303
- Y.S. Chang, Recent developments in microbial biotransformation and biodegradation of dioxins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15 (2008) 152-171.
- Q. Chaudhry, M. Blom-Zandstra, S.K. Gupta, E. Joner, Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 12 (2005) 34–48.

- S.A. Cheema, M.I. Khan, X. Tang, C. Shen, M. Farooq, Y. Chen, Surfactant enhanced pyrene degradation in the rhizosphere of tall fescue *Festuca arundinacea*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 18129–18136.
- W.-Y. Chen, J.-H. Wu, Y.-Y. Lin, H.-J. Huang, J.-E. Chang, Bioremediation potential of soil contaminated with highly substituted polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: microcosm study and microbial community analysis. *J. Hazard. Mater.* 261 (2013) 351–361.
- S. Covino, T. Stella, T. Cajthaml., Mycoremediation of organic pollutants: Principles, opportunities, and pitfalls, in: D. Purchase (Ed), *Fungal applications in sustainable environmental biotechnology*, Fungal Biology, Springer International Publishing, Switzerland, 2016, pp 185-231.
- S.D. Cunningham, D.R. Berti, E.I. Dupont, Phytoremediation of contaminated soils: progress and promise. Part of 205th American Chemical Society national meeting, Symposium Bioremediation Bioprocessing, 13 (1993) 265–268.
- S. Fan, P. Li, Z. Gong, W. Ren, N. He, Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa *Medicago sativa* L.. *Chemosphere* 71 (2008) 1593–1598.
- J.A. Field, R. Sierra-Alvarez, Microbial degradation of chlorinated dioxins. *Chemosphere* 71 (2008) 1005–1018.
- S. Grant, M. Mortimer, G. Stevenson, D. Malcolm, C. Gaus, Facilitated transport of dioxins in soil following unintentional release of pesticide-surfactant formulations. *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 406–411.
- M.M. Häggblom, I.D. Bossert, Halogenated organic compounds: a global perspective, in: M. M. Häggblom and I. D. Bossert (Eds), *Dehalogenation: microbial processes and environmental applications*. Kluwer Academic, New York, 2003, pp. 3-29.
- R.U. Halden, B.G. Halden, D.F. Dwyer, Removal of dibenzofuran, dibenzo-p-dioxin, and 2-chlorodibenzo-p-dioxin from soils inoculated with *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 2246–2249.
- A. Hanano, I. Almousally, M. Shaban, Phytotoxicity effects and biological responses of *Arabidopsis thaliana* to 2,3,7,8-tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin exposure. *Chemosphere* 104 (2014) 76–84.
- A. Hanano, I. Almousally, M. Shaban, N. Moursel, A. Shahadeh, E. Alhajji, Differential tissue accumulation of 2,3,7,8-Tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin in *Arabidopsis thaliana* affects plant chronology, lipid metabolism and seed yield. *BMC Plant Biol.* 15 (2015) 193.
- A. Hiraishi, Biodiversity of dehalorespiring bacteria with special emphasis on polychlorinated biphenyl/dioxin dechlorinators. *Microbes Environ.* 23 (2008) 1–12.
- M. Ionescu, K. Beranova, V. Dudkova, L. Kochankova, K. Demnerova, T. Macek, M. Mackova, Isolation and characterization of different plant associated bacteria and their potential to degrade polychlorinated biphenyls. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63 (2009) 667–672.

- J.R. Jeon, K. Murugesan, P. Baldrian, S. Schmidt, Y.S. Chang, Aerobic bacterial catabolism of persistent organic pollutants - potential impact of biotic and abiotic interaction. *Curr. Opin. Biotechnol.* 38 (2016) 71–78.
- E.J. Joner, C. Leyval, Rhizosphere gradient of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 2371-2375.
- S. Kaiya, O. Rubaba, N. Yoshida, T. Yamada, A. Hiraishi, Characterization of *Rhizobium naphthalenivorans* sp. nov. with special emphasis on aromatic compound degradation and multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58 (2012) 211–224.
- T. Keim, W. Francke, S. Schmidt, P. Fortnagel, Catabolism of 2,7-dichloro- and 2,4,8-trichlorodibenzofuran by *Sphingomonas* sp strain RW1. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 23 (1999) 3359-3363.
- R.E. Koske, J.N. Gemma, A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* 92 (1989) 486–488.
- I. Kuiper, E.L. Lagendijk, G.V. Bloemberg, B.J.J Lugtenberg, Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17 (2004) 6–15.
- I. Lenoir, J. Fontaine, A. Lounès-Hadj Sahraoui, Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry* 123 (2016) 4–15.
- I. Lenoir, A. Lounès-Hadj Sahraoui, F. Laruelle, Y. Dapé, J. Fontaine, Arbuscular mycorrhizal wheat inoculation promotes alkane and polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation: Microcosm experiment on aged-contaminated soil. *Environ. Pollut.* 213 (2016) 549–560.
- H.K. Lichtenthaler, Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148 (1987) 350–382.
- W.W. Liu, R. Yin, X.G. Lin, J. Zhang, X.M. Chen, X.Z. Li, T. Yang, Interaction of biosurfactant-microorganism to enhance phytoremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) contaminated soils with alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Huan Jing Ke Xue* 31 (2010) 1079–1084.
- T. Macek, M. Macková, J. Káš, Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnol. Adv.* 18 (2000) 23–34.
- M. Magnin-Robert, P. Letousey, A. Spagnolo, F. Rabenoelina, L. Jacquens, L. Mercier, C. Clément, F. Fontaine, Leaf stripe form of esca induces alteration of photosynthesis and defence reactions in presymptomatic leaves. *Func. Plant Biol.* 38 (2011) 856-866.
- N. Manickam, A. Bajaj, H.S. Saini, R. Shanker, Surfactant mediated enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane HCH isomers by *Sphingomonas* sp. NM05. *Biodegradation* 23 (2012) 673–682.
- E. Marco-Urrea, I. Garcia-Romera, E. Aranda, Potential of non-ligninolytic fungi in bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. *N. Biotechnol.* 32 (2015) 620–628.

- T.P. McGonigle, M.H. Miller, D.G. Evans, G.L. Fairchild, J.A. Swan, A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115 (1990) 495–501.
- M. Megharaj, R.M. Wittich, R. Blasco, D.H. Pieper, K.N. Timmis, Superior survival and degradation of dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran in soil by soil-adapted *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48 (1997) 109–114.
- G. Mustafa, B. Randoux, B. Tisserant, J. Fontaine, M. Magnin-Robert, A. Lounès-Hadj Saharaoui. Phosphorus supply, arbuscular mycorrhizal fungal species, and plant genotype impact on the protective efficacy of mycorrhizal inoculation against wheat powdery mildew. *Mycorrhiza* 26 (2016) 685–697.
- K. Nakamiya, S. Hashimoto, H. Ito, J.S. Edmonds, A. Yasuhara, M. Morita, Degradation of dioxins by cyclic ether degrading fungus, *Cordyceps sinensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 248 (2005) 17–22.
- I.-H. Nam, Y.-M. Kim, S. Schmidt, Y.-S. Chang, Biotransformation of 1,2,3-tri- and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-p- dioxin by *Sphingomonas wittichii* Strain RW1. *Appl. Env. Microbil.* 72 (2006) 112–116.
- A.S. Nayak, M.H. Vijaykumar, T.B. Karegoudar, Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63 (2009) 73–79.
- C.O. Nwoko, Effect of arbuscular mycorrhizal AM fungi on the physiological performance of *Phaseolus vulgaris* grown under crude oil contaminated soil. *J. Geosci. Environ. Prot.* 2 (2014) 9–14.
- C. Perrot-Rechenmann, Cellular responses to auxin: division versus expansion. (2015) 1–16. doi:10.1101/cshperspect.a001446.
- J.M. Phillips, D.S. Hayman, Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55 (1970) 158–161.
- F. Pollitt, Polychlorinated dibenzodioxins and polychlorinated dibenzofurans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 30 (1999) S63-8.
- M.A. Providenti, H. Lee, H., J.T. Trevors, Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *J. Ind. Microbiol.* 12 (1993) 379–395.
- J. Rezek, C. in der Wiesche, M. Mackova, F. Zadrazil, T. Macek, The effect of ryegrass *Lolium perenne* on decrease of PAH content in long term contaminated soil. *Chemosphere* 70 (2008) 1603–1608.
- S.R. Rissato, M.S. Galhiane, J.R. Fernandes, M. Gerenutti, H.M. Gomes, R. Ribeiro, M.V. de Almeida. Evaluation of *Ricinus communis* L. for the phytoremediation of polluted soil with organochlorine pesticides. *Biomed Res. Int.* (2015) ID 549863, 8.

- D.A.M. Rocha, J.P.M. Torres, K. Reichel, E.H. Novotny, L.F. Estrella, R.O. Medeiros, A.D. Pereira Netto, Determination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans PCDD/Fs in Brazilian cow milk. *Sci. Total Environ.* 572 (2016) 177–184.
- P.D. Schloss, S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G. Thallinger, D.J. Horn, C.F. Van Weber 2009. Introducing mothur: open source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7537-7541. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01541-09>.
- C. Shen, X. Tang, S.A. Cheema, C. Zhang, M.I. Khan, F. Liang, X. Chen, Y. Zhu, Q. Lin, Y. Chen, Enhanced phytoremediation potential of polychlorinated biphenyl contaminated soil from e-waste recycling area in the presence of randomly methylated-beta-cyclodextrins. *J. Hazard. Mater.* 172 (2009) 1671–1676.
- K.H. Shin, K.W. Kim, Y. Ahn, Use of biosurfactant to remediate phenanthrene-contaminated soil by the combined solubilization-biodegradation process. *J. Hazard. Mater.* 137 (2006) 1831–1837.
- M.A. Tabatabai, Soil enzymes, in: A.L. Page, R.H. Miller, D. R. Keeney (Eds.), *Methods of soil analysis. II. Chemical and microbiological properties*, 2nd Edn., American Society of Agronomy, Madison, 1982, pp. 903-947.
- Y. Teng, Y. Luo, X. Sun, C. Tu, L. Xu, W. Liu, Z. Li, P. Christie, Influence of arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* on phytoremediation by alfalfa of an agricultural soil contaminated with weathered PCBs: a field study. *Int. J. Phytoremediation* 12 (2010) 516–533.
- E.A. Tsavkelova, T.A. Cherdyntseva, S.Y. Klimova, A.I. Shestakov, S.G. Botina, A.I. Netrusov, Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Arch. Microbiol.* 188 (2007) 655–664.
- C. Tu, Y. Teng, Y. Luo, X. Sun, S. Deng, Z. Li, W. Liu, Z. Xu, PCB removal, soil enzyme activities, and microbial community structures during the phytoremediation by alfalfa in field soils. *J. Soils Sediments* 11 (2011) 649–656.
- O. Uhlik, L. Musilova, J. Ridl, M. Hroudova, C. Vlcek, J. Koubek, M. Holeckova, M. Mackova, T. Macek, Plant secondary metabolite-induced shifts in bacterial community structure and degradative ability in contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 9245–9256.
- M. Urbaniak, A. Wyrwicka, M. Zieliński, J. Mankiewicz-Boczek, Potential for phytoremediation of PCDD/PCDF-contaminated sludge and sediments using Cucurbitaceae plants: a pilot study. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97 (2016) 401–406.
- M. Urbaniak, M. Zieliński, A. Wyrwicka, The influence of the Cucurbitaceae on mitigating the phytotoxicity and PCDD/PCDF content of soil amended with sewage sludge. *International Journal of Phytoremediation.* 19 (2017) 207-213.
- M. Viisimaa, O. Karpenko, V. Novikov, M. Trapido A. Goi, Influence of biosurfactant on combined chemical-biological treatment of PCB-contaminated soil. *Chem. Eng. J.* 220 (2013) 352–359.

- M. Villacieros, B. Power, M. Sánchez-Contreras, J. Lloret, R.I. Oruezabal, M. Martín, F. Fernández-Piñas, I. Bonilla, C. Whelan, D.N. Dowling, R. Rivilla, Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa *Medicago sativa* rhizosphere. *Plant Soil* 251 (2003) 47–54.
- Y. Wang, H. Oyaizu, Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 168 (2009) 760–764.
- R.M. Wittich, H. Wilkes, V. Sinnwell, W. Francke, P. Fortnagel, Metabolism of dibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 1005–1010.
- F.Y. Wu, X.Z. Yu, S.C. Wu, X.G. Lin, M.H. Wong, Phenanthrene and pyrene uptake by arbuscular mycorrhizal maize and their dissipation in soil. *J. Hazard. Mater.* 187 (2011) 341–347.
- A. Yateem, T. Al-Sharrah, A. Bin-Haji, Investigation of microbes in the rhizosphere of selected grasses for rhizoremediation of hydrocarbon contaminated soils. *Soil Sediment Contam.* 16 (2007) 269–280.
- X.Z. Yu, S.C. Wu, F.Y. Wu, M.H. Wong, Enhanced dissipation of PAHs from soil using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. *J. Hazard. Mater.* 186 (2011) 1206–1217.
- H. Zhang, J. Chen, Y. Ni, Q. Zhang, L. Zhao, Uptake by roots and translocation to shoots of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in typical crop plants. *Chemosphere* 76 (2009) 740–746.
- J. Zhang, R. Yin, X. Lin, W. Liu, R. Chen, X. Li, Interactive effect of biosurfactant and microorganism to enhance phytoremediation for removal of aged polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *J. Heal. Sci.* 56 (2010) 257–266.
- X. Zhou, J. Zhou, X. Xiang, Impact of four plant species and arbuscular mycorrhizal AM fungi on polycyclic aromatic hydrocarbon PAH dissipation in spiked soil. *Polish J. Environ. Stud.* 22 (2013) 1239–1245.
- L. Zhu, M. Zhang, Effect of rhamnolipids on the uptake of PAHs by ryegrass. *Environ. Pollut.* 156 (2008) 46–52.

Synthèse générale et perspectives

**Synthèse générale &
Perspectives**

Synthèse et perspectives

Depuis une vingtaine d'années, les émissions de PCDD/F ont nettement diminué avec la fermeture d'installations industrielles hors normes et la mise en place de systèmes de traitement des rejets atmosphériques industriels plus performants en France et de par le monde. Malheureusement, du fait de la grande persistance de ces molécules organiques chlorées, il n'en va pas de même du principal milieu récepteur de PCDD/F que constitue le sol. En raison des risques toxiques que ces sols pollués représentent pour l'Homme et l'environnement, leur gestion et leur remédiation sont donc devenues une priorité aussi bien pour les pouvoirs publics que pour les scientifiques. Au cours des deux dernières décennies, nous avons assisté à l'émergence des phytotechnologies reconnues pour leur meilleure adéquation avec le développement durable et leur faible coût de mise en place et de suivi d'exploitation. De plus, ces techniques sont particulièrement adaptées aux traitements *in situ* de grandes surfaces contaminées avec des composés organiques tels que les PCDD/F, contaminants comptant parmi les plus récalcitrants et les plus toxiques. Elles permettent également la préservation des fonctions du sol comme support de culture ou réservoir de la biodiversité et peuvent ainsi contribuer à un changement d'usage de ces sols dégradés. Parmi ces bio-procédés innovants et bien adaptés aux polluants organochlorés figure la phytoremédiation assistée par les CMA. En effet, de nombreux travaux décrivent l'intérêt des CMA dans la rhizodégradation de composés organochlorés comme les PCB (Teng et al., 2010 ; Li et al., 2011 ; Qin et al., 2016). En revanche, à notre connaissance, peu de travaux décrivent la phytoremédiation des sols contaminés par les PCDD/F dans la littérature (Wang et Oyaizu en 2009). Ceci s'explique probablement par la faible biodégradabilité de ces molécules chlorées aux structures complexes mais, peut être aussi à cause de leur coût analytique élevé.

C'est pourquoi, le principal objectif de ce travail de thèse a consisté en l'étude des performances de la phytoremédiation assistée, en particulier par les CMA, d'un sol historiquement pollué par les PCDD/F.

Notre étude a été conduite, en microcosmes, sur un sol agricole historiquement pollué par les PCDD/F prélevé sur la parcelle expérimentale de la ferme de Noir Pot située à l'arrière du site de l'ancien incinérateur d'Halluin à l'origine de la pollution. Malgré un niveau de contamination modéré et hétérogène de la parcelle (de 40 à 300 ng/kg de sol), celui-ci a peu

évolué en une dizaine d'années démontrant ainsi une atténuation naturelle limitée dans le temps en lien avec la faible biodégradabilité de ces molécules chlorées.

Les plantes, associées avec leurs communautés microbiennes rhizosphériques, ont la capacité de dépolluer les sols contaminés. Elles peuvent dégrader les composés organiques, soit directement en absorbant puis en phytodégradant les polluants, soit indirectement en stimulant le développement de la flore microbienne rhizosphérique (rhizodégradation) impliquée dans la dégradation des PCDD/F. Les mécanismes intervenant dans la phytoremédiation sont complexes et impliquent des interactions entre les plantes, les bactéries, les champignons saprotrophes et les champignons symbiotiques mycorhiziens. L'identification des communautés microbiennes des sols pollués permet de déterminer le potentiel de ces sols fortement anthropisés dans la rhizodégradation des POP. Malheureusement, très peu de microorganismes sont cultivables, d'où la difficulté de les isoler, de les identifier et d'en connaître leur fonction. Ce verrou commence à être levé ces dernières années grâce à la métagénomique, méthode innovante de biologie moléculaire permettant l'identification de nombreuses espèces par le séquençage à haut débit et l'exploitation des bases de données existantes.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons procédé à l'étude des communautés microbiennes associées aux plantes à capacité remédiatrice des sols pollués et de leur éventuelle contribution à la dégradation des PCDD/F. La caractérisation de ces communautés microbiennes a été effectuée en fonction de trois paramètres : l'espèce végétale, l'origine de l'inoculum mycorhizien et l'ajout d'amendements biologiques.

1. Influence de l'espèce végétale et de l'inoculation mycorhizienne sur les communautés microbiennes du sol et sur la dissipation des PCDD/F dans un sol stérilisé ou non

L'un des paramètres clés qui peut influencer l'efficacité de la phytoremédiation est le choix de l'espèce végétale la plus appropriée au sol contaminé à dépolluer. De nombreux travaux ont montré que la concentration et la composition des exsudats racinaires ainsi que l'architecture racinaire varient en fonction des espèces végétales, ce qui aura des conséquences sur la structure des communautés microbiennes *via* une modulation de la richesse, de l'abondance et de la composition spécifique de ces communautés colonisant les tissus racinaires et le sol rhizosphérique (Marschner et al., 2001; Berg et Smalla 2009 ; Aleklett et al., 2015).

Ainsi, le premier objectif de la présente thèse a consisté à évaluer les capacités de différentes espèces végétales (trèfle, ray-grass, luzerne, blé, miscanthus, fétuque et un mélange commercial de 16 plantes) à se développer sur ce sol historiquement contaminé par les PCDD/F et à favoriser la dissipation de ces polluants en présence et en absence d'un inoculum mycorhizien commercial (Solrhize®). Ce travail a été réalisé à la fois sur un sol stérilisé afin d'évaluer l'apport de l'inoculation mycorhizienne exogène dans la dissipation des PCDD/F (tout en évitant la mycorhization spontanée des plantes par les spores de CMA indigènes) et également sur un sol non stérilisé pour se rapprocher des conditions réelles du terrain. Après 20 semaines de culture, la totalité de ces espèces végétales se sont avérées capables de se développer sur le sol contaminé d'Halluin, qu'il soit stérilisé ou non. Suite à l'introduction de l'inoculum commercial dans le sol stérilisé ou à la présence de spores autochtones dans le sol non stérilisé, l'ensemble de ces espèces végétales étaient mycorhizées avec un taux satisfaisant. Alors qu'aucune dissipation n'a été observée après 20 semaines de culture dans le sol non stérilisé, une diminution plus marquée des concentrations résiduelles de PCDD/F a été détectée dans le sol stérilisé après végétalisation. Aucune amélioration de cette dissipation n'a été observée suite à la mycorhization avec l'inoculum commercial utilisé dans cette étude (Solrhize®) et cela aussi bien dans les conditions de sol stérilisé ou non. Néanmoins, il est à signaler que la végétalisation du sol et l'inoculation mycorhizienne modulent les communautés microbiennes du sol, notamment bactériennes et fongiques, mais pas les Archées. De plus, conformément à ce qui a été décrit dans la littérature sur d'autres sols, le nombre d'OTUs, la richesse et la diversité des communautés bactériennes, archéennes et fongiques sont nettement plus élevés dans le sol non stérilisé par rapport au sol stérilisé (McNamara et al., 2003). Certaines communautés bactériennes (Bacillales, Sphingomonadales et TM7-1) et fongiques (Microascales, Orbiliales et Pezizales) sont plus abondantes dans le sol stérilisé par rapport au sol non stérilisé. La stérilisation du sol permet à certaines communautés d'émerger pendant la recolonisation du sol. Il est intéressant de noter que certaines communautés bactériennes comme les Bacillales, Burkholderiales, Caulobacteriales, Elin 323, Rhizobiales, Rhodospirillales et Sphingomonadales et les Pezizales pour les communautés fongiques sont associées à la dissipation de PCDD/F dans le sol stérilisé végétalisé.

2. Influence de l'origine des inocula mycorhiziens sur les communautés microbiennes du sol et sur la dissipation des PCDD/F

Pour cette partie de l'étude, deux espèces végétales ont été sélectionnées : (i) la luzerne qui avait déjà démontré son efficacité dans la dissipation de composés chlorés comme les PCB lors d'études précédentes (Xu et al., 2010 ; Teng et al., 2010 ; Li et al., 2013), et (ii) la fétuque décrite dans la littérature pour son impact sur les PCB (Chekol et al., 2004 ; Li et al., 2013 ; Secher et al., 2013), mais également dont le potentiel à dissiper les PCDD/F a été mis en évidence lors de notre première expérimentation. Chacune de ces plantes a été associée à deux inocula mycorhiziens, un commercial et un autre autochtone, afin de déterminer si l'origine de l'inoculum pouvait avoir une importance sur la dissipation des PCDD/F dans le sol. Il est, en effet, admis que les espèces mycorhiziennes isolées à partir de sols contaminés sont généralement plus tolérantes aux polluants présents dans le sol et mieux adaptées aux conditions climatiques et édaphiques du site, mais très peu d'études sont disponibles à ce sujet (Weissenhorn et al., 1995). Ainsi, l'influence sur la dissipation des PCDD/F de deux inocula mycorhiziens, un premier inoculum commercial à base de *F. mosseae* et *Glomus sp.*, et un second, autochtone (produit à l'UCEIV à partir du piégeage des spores contenues dans le sol pollué de la Ferme du Noir Pot à base de plusieurs espèces de CMA : *G. constrictum*, *G. lamellosum*, *G. geosporum* et *F. mosseae*), a été comparé. Par ailleurs, afin d'accroître la rhizodégradation des PCDD/F dans le sol, le temps de culture a été prolongé de 4 semaines par rapport aux conditions initiales, soit 24 semaines de culture.

L'inoculation de la luzerne et de la fétuque par ces deux types d'inoculum a permis l'obtention d'un bon taux de mycorhization (40 à 70%). En revanche, seul l'inoculum commercial a permis d'obtenir une meilleure croissance de la partie aérienne chez ces deux espèces végétales. Dans cette expérimentation, une dissipation des PCDD/F de 22 à 35% a été obtenue en 24 semaines dans le sol végétalisé (dissipation de 16 et 35 ng/kg de sol pour la luzerne et la fétuque respectivement par rapport au sol non végétalisé). Cette végétalisation a permis de stimuler l'activité microbienne globale du sol, mise en évidence par les activités enzymatiques de la fluorescéine di-acétate hydrolase et de la déshydrogénase, et plus spécifiquement certaines communautés bactériennes et fongiques susceptibles d'être impliquées dans la dissipation des PCDD/F, les Planctomycetia, les Solibactères et les Pezizomycètes. En revanche, malgré une augmentation du nombre d'OTUs bactériens (en particulier avec l'inoculum autochtone) et de la richesse microbienne (bactérienne, archéenne

et fongique), aucune amélioration de la dissipation des PCDD/F n'a été observée suite à l'inoculation mycorhizienne de la luzerne et de la fétuque, quelle que soit l'origine de l'inoculum.

3. Influence des amendements sur le taux de dissipation des PCDD/F

Il est généralement admis que l'efficacité de la rhizodégradation dépend de la biodisponibilité des polluants dans le sol qui sont fortement adsorbés sur les particules du sol (Hwang & Cutright, 2002; Leonardi et al., 2007). Ainsi, plusieurs stratégies ont été envisagées lors de cette dernière partie de la thèse afin d'améliorer le taux de dissipation des PCDD/F. Tout d'abord, nous avons procédé au dopage du sol (augmentation de 25% des teneurs initiales) afin d'augmenter la fraction de PCDD/F biodisponible. En effet, de nombreux travaux menés en microcosmes avec des sols artificiellement contaminés (dopés) ont révélé l'intérêt de la phytoremédiation assistée pour la dissipation des polluants organiques tels que les hydrocarbures (Joner et al., 2001 ; Liu et al., 2004 ; Wu et al., 2008 ; Gao et al., 2011 ; Nwoko et al., 2014). Mais, à ce jour, très peu d'études ont été menées sur des sols pollués par les PCDD/F. Par ailleurs, nous avons fait le choix de travailler dans le cadre de cette thèse sur un sol historiquement contaminé. Or, ces sols ont la particularité de présenter une biodisponibilité et donc une biodégradabilité faibles, ce qui rend leur remédiation plus complexe. C'est pourquoi, nous avons ajouté un biosurfactant consistant en un mélange de rhamnolipides, afin d'accroître la biodisponibilité des PCDD/F dans le sol. Par ailleurs, étant donné que l'efficacité de la bioremédiation dépend également du potentiel dégradant du microbiote du sol, celui-ci a été inoculé avec une bactérie, *Sphingomonas wittichii* RW1, décrite pour ses capacités de dégradation des PCDD/F. Nous avons également réintroduit dans le sol stérilisé la flore microbienne autochtone issue du sol contaminé d'Halluin. Dans cette expérimentation, nous avons travaillé avec une seule des deux espèces végétales testées précédemment, la luzerne. Dans nos conditions expérimentales, il apparaît que l'action combinée des différents amendements permet d'accroître la dissipation des PCDD/F en 24 semaines de culture. En effet, une dissipation de 48 ng/kg de la teneur totale en PCDD/F dans le sol a été obtenue contre 25,5 ng/kg en moyenne dans les conditions expérimentales décrites précédemment (publication 2), ce qui correspond à une amélioration du taux de dissipation multiplié par un facteur 2. La plus grande part de cette dissipation résulterait d'une biodégradation (22,45 %). En effet, la bioaccumulation de PCDD/F dans les racines (0,45 %) ainsi que leur transfert dans la partie aérienne de la plante (0,09 %) sont très

faibles. Ce dernier résultat est important à souligner car c'est l'une des conditions nécessaires pour éliminer tout risque de contamination de la chaîne alimentaire. Par ailleurs, des tests de cytotoxicité réalisés avant et après traitement ont montré une réduction de la toxicité du sol contaminé après la phytoremédiation assistée. Cette évaluation du risque éventuel résultant des sous-produits issus de la dégradation des PCDD/F est indispensable pour la mise en application de cette méthode de remédiation.

De plus, nos résultats ont montré que cette dégradation des PCDD/F résulterait de la stimulation de l'activité microbienne globale du sol (induction des activités enzymatiques de la fluorescéine di-acétate hydrolase et de la déshydrogénase) et de l'augmentation de l'abondance, de la richesse et de la diversité bactérienne, ainsi que de la richesse fongique dans le sol, et en particulier des Actinobactéries, Proteobactéries, Chloroflexi pour les bactéries et des Sordariales pour les champignons.

En conclusion, l'ensemble des résultats présentés lors de ce travail de thèse mettent en évidence le potentiel de la luzerne et de la fétuque dans la rhizodégradation des PCDD/F dans un sol historiquement pollué. Néanmoins, cette dégradation est plus marquée dans le sol préalablement stérilisé, puis recolonisé par certaines communautés microbiennes spécifiques, impliquées dans la dissipation des PCDD/F. Cette recolonisation du sol par les communautés microbiennes, et notamment celles impliquées dans la dissipation des PCDD/F, diffère selon les conditions expérimentales. La recolonisation du sol dépend probablement de la diversité initiale des communautés microbiennes du sol, des espèces végétales et de l'inoculation mycorhizienne. La végétalisation du sol permet de moduler la structure des communautés microbiennes, notamment des populations impliquées dans la dissipation des PCDD/F. En revanche, bien que la mycorhization agisse sur les communautés microbiennes du sol, celle-ci ne semble pas avoir d'impact, dans nos conditions expérimentales, sur la dissipation des PCDD/F et cela quelles que soit l'origine de l'inoculum utilisée et les espèces mycorhiziennes qui le compose. Cette absence d'efficacité pourrait être due à une trop faible biodisponibilité des polluants, les PCDD/F « historiques » étant trop complexés aux particules du sol pour pouvoir être accessibles aux populations microbiennes. Par ailleurs, lorsque la biodisponibilité d'un polluant est faible, les microorganismes du sol auraient tendance à privilégier la dégradation des sources de carbones exsudées par les plantes que le polluant adsorbé à la matrice sol (Bourceret, 2016). Ainsi, suite à une modulation de la qualité et de la quantité des exsudats racinaires de la plante en réponse à la mycorhization, hypothèse qui mériterait d'être

validée dans le futur, une compétition se mettrait en place entre les sources de carbone disponibles (exsudats) et celles plus complexes (PCDD/F) pour la dégradation microbienne.

L'ensemble de nos résultats souligne donc la complexité des mécanismes rhizosphériques qui contrôlent le processus de dégradation de ces composés chlorés. Considérant ces différents points et pour aller plus loin dans la compréhension des processus qui contrôlent le devenir de ces polluants dans le sol, il faudrait :

1. Mieux appréhender les mécanismes impliqués dans la biodégradation des PCDD/F,

- En identifiant plus spécifiquement les communautés microbiennes (bactériennes et fongiques) impliquées dans la biodégradation des PCDD/F et donc faire le lien entre la structure et la fonction des microorganismes impliqués dans cette dégradation (Martin et al., 2012). Pour cela, une méthode de marquage isotopique, le DNA stable-isotope probing (DNA-SIP), est une technique permettant d'identifier les microorganismes métaboliquement actifs d'une communauté, par assimilation de substrats carbonés marqués au ^{13}C (Leigh et al., 2007).
- En complétant ce travail de thèse par une étude de génomique fonctionnelle afin de déterminer le potentiel métabolique « dégradant » des communautés microbiennes du sol contaminé *via* l'analyse de certains gènes bactériens et fongiques codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation des PCDD/F telles que les dioxygénases (Habe et al., 2001 ; Chakraborty et Das, 2016) et/ou les cytochromes P450 (CYPBM3) (Hanano et al., 2014).
- En identifiant les métabolites de biodégradation des PCDD/F par GC/HRMS en utilisant des PCDD/F radiomarquées au ^{14}C par exemple, permettant donc d'approfondir la compréhension de la voie métabolique utilisée et de suivre l'évolution de la toxicité des polluants (métabolites secondaires plus ou moins toxiques).

2. Etudier le rôle des CMA et de leur interaction avec les communautés microbiennes du sol dans la dégradation des PCDD/F,

- En identifiant par des outils moléculaires les CMA dans le sol contaminé et en particulier dans les racines afin de suivre la capacité de colonisation des espèces mycorhiziennes qui composent l'inoculum introduit dans le sol. La détection et la quantification du niveau de mycorhization couramment effectuée à l'aide d'un colorant non vital, permet certes d'estimer le taux de mycorhization, mais ne donne aucun renseignement ni sur l'identité des CMA présents dans les racines ni sur la fonctionnalité de la symbiose. Or, cette information est absolument nécessaire pour bien maîtriser l'inoculation dirigée et son obtention nécessite le développement d'outils moléculaires de diagnostic. Plusieurs publications font état de l'existence de sondes moléculaires taxons spécifiques qui peuvent être exploitées pour développer des méthodes moléculaires de quantification (Pivato et al., 2007, Beudet et al., 2013; De la Providencia et al., 2013; Nadimi et al., 2016 ; Badri et al., 2016). De plus, le développement des technologies de séquençage rapide (NGS, Next Generation Sequencing) ouvre de nouvelles perspectives dans l'identification plus précise des espèces mycorhiziennes retrouvées dans les racines des plantes des sols contaminés, ainsi que, plus en amont de la cinétique de colonisation des plantes par les CMA. Ainsi l'amplification de marqueurs moléculaires, "internal transcribed spacers" ITS ou des intergenic spacers IGS et leur séquençage permettent à la fois d'observer la présence de divers espèces de CMA dans les racines et d'ajouter une notion de « quantité » en estimant leur abondance.
- En étudiant, à l'aide de rhizobox, le rôle des réseaux mycéliens des CMA et leur capacité à induire la dégradation des PCDD/F dans le sol. En effet, Qin et al. (2016) ont démontré récemment que les réseaux mycéliens des CMA et leurs exsudats induisaient les processus de dissipation des PCB par une modification des communautés microbiennes du sol. Des études réalisées *in vitro* ont également montré que le volume mycélien de ces champignons pouvait augmenter de façon significative la dissipation des polluants organiques tels que les hydrocarbures (Banitz et al., 2013; Schamfuß et al., 2013). Les bactéries utilisent, tout d'abord, le réseau mycélien comme « autoroutes » (*fungal highways*) et se déplacent tout au long des filaments

mycéliens. Ce qui permet une meilleure propagation et exploration des interfaces de contact avec les polluants. Puis, les communautés microbiennes (bactéries, champignons saprotrophes) prennent en charge le polluant pour le dégrader en métabolites assimilables et transportables par les hyphes des CMA « pipelines » (*fungal pipelines*).

3. Générer des ressources microbiologiques et tester l'efficacité de la phytoremédiation assistée grâce à une expérimentation *in situ*.

- La finalité d'une telle étude serait de générer des ressources microbiologiques disponibles issues de la sélection d'espèces et/ou de souches microbiennes spécifiques ayant un potentiel dans la dégradation des polluants organiques de type PCDD/F. Le but étant d'identifier des bactéries et/ou des champignons saprotrophes inféodés aux sols contaminés et d'utiliser des milieux de culture spécifique pour permettre d'optimiser leur isolement. Les souches les plus intéressantes pourront être testées en association avec les CMA autochtones piégées et identifiées au cours de cette thèse.
- En condition non contrôlée, la plante peut être sujette à de nombreuses contraintes environnementales (sécheresse, déficit hydrique, attaques de pathogènes...) pouvant influencer les performances de la phytoremédiation. L'ensemble des résultats obtenu dans le cadre de cette thèse permettra de proposer une méthode de remédiation adaptée aux sols historiquement pollués par les PCDD/F et en particulier au site de la Ferme de Noir Pot en combinant les différents amendements testés préalablement en microcosmes.

Références

Références

Références bibliographiques

Adriaens P, Grabic-Galic D 1994. Reductive dechlorination of PCDD/F by anaerobic cultures and sediments. *Chemosphere* 29: 2253–2259.

Aleklett K, Leff JW, Fierer N, Hart M 2015. Wild plant species growing closely connected in a subalpine meadow host distinct root-associated bacterial communities. *PeerJ* 3:e804.

Aprill W, Sims RC 1990. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20: 253–265. doi: 10.1016/0045-6535(90)90100-8.

Arfmann HA, Timmis KN, Wittich RM 1997. Mineralization of 4-chlorodibenzofuran by a consortium consisting of *Sphingomonas* sp. strain RW1 and *Burkholderia* sp. Strain JWS. *Applied Environmental Microbiology* 63: 3458-3462.

Artursson V, Finlay RD, Jansson, JK 2005. Combined bromodeoxyuridine immunocapture and terminalrestriction fragment length polymorphism analysis highlights differences in the active soil bacterial metagenome due to *Glomus mosseae* inoculation or plant species. *Environmental Microbiology* 7: 1952–1966.

Atlas RM, Bartha R 1998. *Microbial Ecology. Fundamentals and applications.* Addison Wesley Longman, Menlo Park, California, USA, chapitre 8.

Badri A, Stefani FOP, Lachance G, Roy-Arcand L, Beudet D, Vialle A, Hijri M 2016. Molecular diagnostic toolkit for *Rhizophagus irregularis* isolate DAOM-197198 using quantitative PCR assay targeting the mitochondrial genome. *Mycorrhiza* 26:721–733. doi: 10.1007/s00572-016-0708-1.

Banerji SK, Wei SM, Bajpai RK 1993. Pentachlorophenol interactions with soil. *Water Air Soil Pollution* 69: 149-163.

Banitz T, Johst K, Wick LY, Schamfuß S, Harms H, Frank K 2013. Highways versus pipelines: contributions of two fungal transport mechanisms to efficient bioremediation. *Environmental Microbiology*. Rep. 5, 211–218. 10.1111/1758-2229.12002.

Bazin MJ, Markham P, Scott EM, Lynch JM 1990. *Population dynamics and rhizosphere interactions.* Wiley-Interscience Publication.

Beaudet D, Terrat Y, Halary S, De La Providencia IE, Hijri M 2013. Mitochondrial genome rearrangements in *Glomus* species triggered by homologous recombination between distinct mtDNA haplotypes. *Genome Biology Evolution* 5: 1628–1643. doi:10.1093/gbe/evt120

Becklin KM, Hertweck KL, Jumpponen A 2012. Host identity impacts rhizosphere fungal communities associated with three alpine plant species. *Microbial Ecology* 63: 682–693.

Berg G, Smalla K 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 68: 1–13. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x.

Bert V, Lors C, Ponge JF, Caron L, Biaz A, Dazy M, Masfarau JF 2012. Metal immobilization and soil amendment efficiency at a contaminated sediment landfill site: A field study focusing on plants, springtails, and bacteria. *Environmental Pollution* 169: 1-11.

Bertrand JC, Caumette P, Lebaron P, Matheron R, Normand P 2012. *Ecologie Microbienne: Microbiologie des milieux naturels et anthropisés.* Presses universitaires de Pau et des Pays de l'Adour.

Binet P, Portal JM, Leyval C 2000. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant Soil* 227: 207–213. doi:10.1023/A:1026587418611.

Binet P, Portal JM, Leyval C 2001. Application of GC-MS to the study of anthracene disappearance in the rhizosphere of ryegrass. *Organic Geochemistry* 32: 217-222. doi:10.1016/S0146-6380(00)00168-6.

Bonfante P, Perotto S 1995. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* 130: 3-21.

Booth S, Hui J, Alojado Z, Lam V, Cheung W, Zeller D, Steyn D, Pauly D 2013. Global deposition of airborne dioxin. *Marine Pollution Bulletin* 75: 182–86. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.07.041.

Borneman J, Skroch PW, O'Sullivan KM 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied Environment Microbiology* 62: 1935-1943.

Borneman J, Triplett EW 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied Environment Microbiology* 63: 2647-2653.

Brady NC, Weil RR 2010. Elements of the nature and properties of soils. Pearson Prentice Hall

Broeckling CD, Broz AK, Bergelson J, Manter DK, Vivanco JM 2008. Root Exudates Regulate Soil Fungal Community Composition and Diversity. *Applied Environmental Microbiology* 74: 738–744.

Brooks RR 1997. Plant hyperaccumulators of metals and their role in mineral exploration, archaeology, and land remediation. Dans: Remediation of soils contaminated with metals. Proceedings of a conference on the biochemistry of Trace elements, Taiwan, pp. 123-133.

Brundrett MC. 2008. *Mycorrhizal Associations: The Web Resource*. Date accessed. <mycorrhizas.info>.

Buée M, Reich M, Murat C, Nilsson RH, Uroz S, Martin F 2009. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist* 184: 449–456. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03003.x.

Bumpus M, Tien D, Wright SD 1985. Oxidation of persistent environmental-pollutants by a white root fungi. *Science* 228: 1434–1436.

Bunge M, Adrian L, Kraus A, Opel M, Lorenz WG, Andreesen JR, Görisch H, Lechner U 2003. Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. *Nature* 42: 1357–360.

Bunge M, Wagner A, Fischer M,, Andreesen JR, Lechner U 2008. Enrichment of a dioxin-dehalogenating *Dehalococcoides* species in two-liquid phase cultures, *Environmental Microbiology* 10: 2670–2683.

Campanella B, Paul R 2000. Presence, in the rhizosphere and leaf extracts of zucchini (*Cucurbita pepo* L.) and melon (*Cucumis melo* L.) of molecules capable of increasing the apparent aqueous solubility of hydrophobic pollutants. *Int. J. Phytoremediation* 2: 145–158.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R 2010. QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data. *Nature Methods* 7: 335–336. doi:10.1038/nmeth.f.303

Chakraborty J, Das S 2016. Molecular perspectives and recent advances in microbial remediation of persistent organic pollutants. *Environmental Science Pollution Research* 23:883-903. doi: 10.1007/s11356-016-6887-7.

Chang YS 2008. Recent developments in microbial biotransformation and biodegradation of dioxins. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 15: 152 - 171.

Chao A 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* 265–270.

Cheema SA, Khan MI, Tang X, Shen C, Farooq M, Chen Y 2016. Surfactant enhanced pyrene degradation in the rhizosphere of tall fescue *Festuca arundinacea*. *Environmental Science Pollution Research* 23: 18129–18136.

Chekol T, Vough LR, Chaney RL 2004. Phytoremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils: The rhizosphere effect. *Environment International* 30: 799–804. doi:10.1016/j.envint.2004.01.008.

Chen WY, Wu JH, Lin YY, Huang HJ, Chang JE 2013. Bioremediation potential of soil contaminated with highly substituted polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: microcosm study and microbial community analysis. *Journal of Hazardous Materials* 261: 351–361.

Chroma L, Mackova M, Kucerova P, In Derwiesche C, Burkhard J, Macek T 2002. Enzymes in plant metabolism of PCBs and PAHs. *Acta Biotechnologia* 22: 35–41.

CITEPA 2016. <https://www.citepa.org/fr/air-et-climat/polluants/polluant-organiques-persistants/dioxines-et-furanes>.

Clark RB, Zeto SK 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Plant Nutrition* 23: 867–902.

Coleman JDO, Blake-Kalff MMA, Emyr Davies TG 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in plant science* 2: 144-151.

Comby M, Mustafa G, Magnin-Robert M, Randoux B, Fontaine J, Reignault Ph, Lounès-Hadj Sahraoui A 2017. Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Potential Bioprotectants Against Aerial Phytopathogens and Pests. PP 195-224. Springer Nature Singapore. DOI 10.1007/978-981-10-4115-0_9

Costa R, Götz M, Mrotzek N, Lottmann J, Berg G, Smalla K 2006. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiology Ecology Wiley* 56: 236–249.

Covino S, Stella T, Cajthaml T 2016. Mycoremediation of Organic Pollutants: Principles, Opportunities, and Pitfalls. *Fungal Applications in Sustainable Environmental Biotechnology* pp 185-231.

Criquet S, Joner EJ, Leglize P, Leyval C 2000. Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa L*). *Biotechnology Letters* 22: 1733-1737.

Dalpe Y 2005. Les mycorhizes : un outil de protection des plantes mais non une panacée. *Phytoprotection* 86: 53-59.

Davey ML, Heegaard E, Halvorsen R, Ohlson M, Kauserud H 2012. Seasonal trends in the biomass and structure of bryophyte-associated fungal communities explored by 454 pyrosequencing. *New Phytologist* 195: 844–856. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04215.x.

De la Providencia IE, Nadimi M, Beudet D, Rodriguez Morales G, Hijri M 2013. Detection of a transient mitochondrial DNA heteroplasmy in the progeny of crossed genetically divergent isolates of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 200: 211–221. doi:10.1111/nph. 12372.

De Vito M, Birnbaum LS 1994. Toxicology of dioxins and related chemicals. In: Schechter A, Dioxins and Health (Ed), New York: Plenum Press 1994: 139-162.

Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Grandmougin-Ferjani A, Shirali P, Lounès-Hadj Sahraoui A 2008. *In vitro* evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. Environmental and Experimental Botany 64: 120-127.

Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Shirali P, Grandmougin-Ferjani A, Lounès-Hadj Sahraoui A 2009. Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. Phytochemistry 70: 1421-1427.

Delafoulhouze M 2016. Développement et application de l'analyse dirigée par l'effet pour la recherche et l'identification de contaminants à risque présents dans les sols des sites pollués.

Delort AM, Vaïtilingom M, Amato P, Sancelme M, Parazols M, Mailhot G, Laj P, Deguillaume L 2010. A short overview of the microbial population in clouds : Potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes. Atmospheric Research 98: 249–260. doi:10.1016/j.atmosres.2010.07.004.

Desai JD, Banat IM 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential, Microbiology and Molecular Biology Reviews 61: 47-64.

Donnelly PK, Hedge RS, Fletcher JS 1994. Growth of PCB-degrading bacteria on compounds from photosynthetic plants. Chemosphere 28 : 981–988.

Dopico M, Gómez A 2015. Review of the current state and main sources of dioxins around the world Review of the current state and main sources of dioxins around the world. Air Waste Manage. Assoc 65: 1033–1049. doi:10.1080/10962247.2015.1058869.

Du XY, Zhu N, Xia X, Xu X 2001. Enhancement of biodegradability of polychlorinated bizenzo-p-dioxins. Environmental Science and Health 36: 1589-1595.

Eppe G, Focant JF, Pirard C, Xhrouet C, Maghuin-Rogister G, De Pauw E 2006. Analyse des dioxines par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-HRMS, GC/MS/MS et GCxGC-TOFMS): Principes, applications et perspectives. Chimie nouvelle N92 juin 2006.

Fennell DE, Nijenhuis I, Wilson SF, Zinder SH, Haggblom MM 2004. *Dehalococcoids ethenogenes* strain 195 reductively dechlorinated diverse chlorinated aromatic pollutants. *Environmental Science and Technology* 38: 2075-2081.

Field JA, de Jong E, Feijoo-Costa G, de Bont J A M 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnology* 11: 44-49.

Field JA, Sierra-Alvarez R 2008. Microbial degradation of chlorinated dioxins. *Chemosphere* 71: 1005-1018.

Fierer N, Bradford MA, Jackson RB 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88: 1354–1364. doi: 10.1890/05-1839

Fierer N, Jackson RB 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 103: 626–631.

Fierer N, Schimel JP, Holden PA 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology Biochemistry* 35: 167–176.

Fierer N, Strickland MS, Liptzin D, Bradford MA, Cleveland CC 2009. Global patterns in belowground communities. *Ecology Letters* 12: 1238–1249.

Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Smyth TJ, Banat, IM 2010. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112 : 617–627.

Fukuda K, Nagata S, Taniguchi H 2002. Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 208: 179–185.

Gabet S 2004. Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique.

Gans J, Wolinsky M, Dunbar J 2005. Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. *Science* 309: 1387–1390.

Gao Y, Cheng Z, Ling W, Huang J 2010. Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae contribute to the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant roots. *Bioresource Technology* 101: 6895-6901.

Gao Y, Li Q, Ling W, Zhu X 2011. Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soils contaminated with phenanthrene and pyrene. *Journal of Hazardous Materials* 185: 703-709.

Gao Y, Zhou Z, Ling W, Hu X, Chen S 2017. Soil Biology & Biochemistry Glomalin-related soil protein enhances the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Soil Biology Biochemistry* 107: 129–132. doi:10.1016/j.soilbio.2017.01.002.

Gilbert ES, Crowley DE 1997. Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1933–1938.

Giller KE, Witter E, McGrath SP 2009. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology Biochemistry* 41: 2031–2037. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.04.026

Gołębiewski M, Deja-Sikora E, Cichosz M, Tretyn A, Wróbel B 2014. 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. *Microbial Ecology* 67: 635–647.

Grant S, Mortimer M, Stevenson G, Malcolm D, Gaus C 2011. Facilitated transport of dioxins in soil following unintentional release of pesticide-surfactant formulations. *Environmental Science Technology* 45: 406–411.

Günther T, Dornberger U, Fritsche W 1996. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 33: 203-215.

Habe H, Ashikawa Y, Saiki Y, Yoshida T, Nojiri H, Omori T 2002. *Sphingomonas* sp. Strain KA1, carrying a carbazole dioxygenase gene homologue, degrades chlorinated dibenzo-p-dioxins in soil. *FEMS Microbiological Letters* 211: 43–49

Habe H, Chung JS, Lee JH, Kasuga K, Yoshida T, Nojiri H, Omori T 2001. Degradation of Chlorinated Dibenzofurans and Dibenzop-Dioxins by Two Types of Bacteria Having Angular Dioxygenases with Different Features. *Applied and environmental microbiology* 67: 3610-3617.

Haichar F el Z, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J, Heulin T, Achouak W 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J* 2: 1221–1230.

- Hassink J, Bouvman LA, Zwart KB, Brussaard L 1993.** Relationships between habitable pore space, soil biota and mineralization rates in grasslands soils. *Soil Biology Biochemistry* 25: 47-55.
- Healy MG, Devine CM, Murphy R 1996.** Microbial production of biosurfactants, *Resources, Conservation and Recycling* 18: 41-57.
- Hernandez BS, Koh SC, Chial M, Focht DD 1997.** Terpene-utilizing isolates and their relevance to enhanced biotransformation of polychlorinated biphenyls in soil. *Biodegradation* 8: 153–158.
- Hertenberger G, Zampach P, Bachmann G 2002.** Plant species affect the concentration of free sugars and free amino acids in different types of soil. *Plant Nutrition Soil Science* 165: 557–565.
- Hinsinger P, Gobran GR, Gregory PJ, Wenzel WW 2005.** Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist* 168: 293–303. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01512.x.
- Hiraishi A 2008.** Biodiversity of dehalorespiring bacteria with special emphasis on polychlorinated biphenyl/dioxin dechlorinators. *Microbes Environment*. 23: 1–12.
- Hong H, Chang YS, Nam IH, Fortnagel P, Schmidt S 2002.** Biotransformation of 2,7-Dichloro- and 1,2,3,4-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin by *Sphingomonas wittichii* RW1. *Applied and environmental microbiology* 68: 2584-2588.
- Hooker JE, Piatti P, Cheshire MV, Watson CA 2007.** Polysaccharides and monosaccharides in the hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus* E3 and *Glomus tenue*. *Soil Biology Biochemistry* 39: 680–683. doi: 10.1016/j.soilbio.2006.08.006
- Hülster A, Müller J, Marschner H 1994.** Soil–plant transfer of polychlorinated dibenzop-dioxins and dibenzofurans to vegetables of the cucumber family (Cucurbitaceae). *Environmental Science Technology* 28: 1110–1115.
- Huntzinger O, Fiedler H 1993.** From source to exposure: some open questions. *Chemosphere* 27: 121–129.

Hwang S, Cutright TJ 2002. Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. *Chemosphere* 47:891-899.

Iffis B, St-Arnaud M, Hijri M 2016. Petroleum hydrocarbon contamination, plant identity and arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) community determine assemblages of the AMF spore-associated microbes. *Environmental Microbiology* 18: 2689–2704. doi:10.1111/1462-2920.13438.

INSERM 2000. Dioxines dans l'environnement - Quels risques pour la santé? Expertise collective.

International Agency for Research on Cancer (IARC) 1997. Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 69.

Isosaari P, Kiviranta H, Lie O, Lundebye AK, Ritchie G, Vartiainen T 2004. Accumulation and distribution of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and polychlorinated biphenyl congeners in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *environmental toxicology chemistry* 23: 1672-9.

Jacobs H, Dennefeld C, Féret B, Viluksela M, Håkansson H, Mark M, Ghyselinck NB 2011. Retinoic acid drives aryl hydrocarbon receptor expression and is instrumental to dioxin-induced toxicity during palate development. *Environmental Health Perspectives* 119: 1590-1595.

Janssen PH 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied Environmental Microbiology* 72: 1719–1728.

Joner EJ, Leyval C 2001. Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biomedical and life sciences* 10: 155-159.

Joner EJ, Leyval C 2003a. Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizosphere interactions. *Sustainable Agriculture* 7: 885-894.

Joner EJ, Leyval C 2003b. Rhizosphere gradient of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environmental Science and Technology* 37: 2371-2375.

Kamei I, Watanabe M, Harada K, Miyahara T, Suzuki S, Matsufuji Y, Kondo R 2009. Influence of soil properties on the biodegradation of 1,3,6,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin and fungal treatment of contaminated paddy soil by white rot fungus *Phlebia brevispora*. *Chemosphere* 75: 1294–1300.

Keim T, Francke W, Schmidt S, Fortnagel P 1999. Catabolism of 2,7- dichloro- and 2,4,8-trichlorodibenzofuran by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Industrial Microbiology Biotechnology* 23: 359-363.

Kitunen VH, Salkinoja-Salonen MS 1990. PCDDs/PCDFs in unbleached pulp. *Chemosphere* 20: 1663-1670.

Kjeller LO, Rappe C 1995. Time trends in levels, patterns, and profiles for polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in a sediment core from the Baltic proper. *Environmental Science Technology* 29: 346–355.

Klaubauf S, Inselsbacher E, Zechmeister-Boltenstern S, Wanek W, Gottsberger R, Strauss J, Gorfer M 2010. Molecular diversity of fungal communities in agricultural soils from Lower Austria. *Fungal Divers* 44: 65–75. doi: 10.1007/s13225-010-0053-1.

Klecka GM, Gibson DT 1980. Metabolism of dibenzo-para-dioxin and chlorinated dibenzo-para-dioxins by a *Beijerinckia* species. *Applied Environmental Microbiology* 39: 288–296.

Köberl M, Müller H, Ramadan EM, Berg G 2011. Desert farming benefits from microbial potential in arid soils and promotes diversity and plant health. *PLoS One* 6: 24452– 24452.

Kowalchuk GA, Buma D, de Boer W, Klinkhamer PG, van Veen JA 2002 Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 509–520. doi: 10.1023/A:1020565523615.

Kucerova P, Mackova M, Chroma L, Burkhard J, Triska J, Demnerova MT 2000. Metabolism of polychlorinated biphenyls by *Solanum nigrum* hairy root clone SNC-90 and analysis of transformation products. *Plant Soil* 225: 109–115.

Kulkarni PS, Crespo JG, Afonso CAM 2008. Dioxins sources and current remediation technologies - A review. *Environmental International* 34: 139–153. doi:10.1016/j.envint.2007.07.009.

Kumar PBAN, Dushenk V, Motto H, Raskin I 1995. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* 29: 1232-1238.

Laha S, Tansel B, Ussawarujikulchai A 2009. Surfactant-soil interactions during surfactant-amended remediation of contaminated soils by hydrophobic organic compounds: A review. *Environmental Management* 90: 95–100. doi:10.1016/j.jenvman.2008.08.006.

Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N 2009. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied Environmental Microbiology* 75: 5111–5120.

LE CLOIREC P et LAPLANCHE A 2005. Réduction des dioxines, furannes et Polychlorobiphényles. *Technique de l'ingénieur. Doc. G 1 820 - 2.*

Le Floch S, Merlin FX, Guillerme M, Dalmazzone C, Le Corre P 1999. A field experimentation on bioremediation: BIOREN. *Environmental Technology* 20: 897–907.

Leigh MB, Fletcher JS, Fu X, Schmitz FJ 2002. Root turnover: an important source of microbial substrates in rhizosphere remediation of recalcitrant contaminants. *Environmental Science Technology* 36: 1579–1583.

Leigh MB, Pellizari VH, Uhlík O, Sutka R, Rodrigues J, Ostrom NE, Zhou J, Tiedje JM 2007. Biphenyl-utilizing bacteria and their functional genes in a pine root zone contaminated with polychlorinated biphenyls (PCBs). *ISME* 1: 134–148.

Leigh MB, Prouzová P, Macková M, Macek T, Nagle DP, Fletcher JS 2006. Polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading bacteria associated with trees in a PCB-contaminated site. *Applied Environmental Microbiology* 72: 2331–2342.

Lenoir I, Fontaine J, Tisserant B, Laruelle F, Lounès-Hadj Sahraoui A 2017. Beneficial contribution of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, in the protection of *Medicago truncatula* roots against benzo [a] pyrene toxicity. *Mycorrhiza* 27: 465–476. doi:10.1007/s00572-017-0764-1.

Lenoir I, Lounès-Hadj Sahraoui A, Laruelle F, Dapé Y, Fontaine J 2016. Arbuscular mycorrhizal wheat inoculation promotes alkane and polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation: Microcosm experiment on aged-contaminated soil. *Environmental Pollution* 213: 549–560.

Leonardi V, Sasek V, Petruccioli M, D'Annibale A, Erbanova P, Cajthaml T 2007. Bioavailability modification and fungal biodegradation of PAHs in aged industrial soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* 60 : 165–170. doi:10.1016/j.ibiod.2007.02.004.

Li JH, Yu XZ, Wu SC, Wang XR, Wang SH, TAM FYN, Wong MH. 2011. Responses of Bioaugmented Ryegrass to PAH Soil Contamination. *International Journal of Phytoremediation* 13: 441–455.

Li Y, Liang F, Zhu Y, Wang F 2013. Phytoremediation of a PCB-contaminated soil by alfalfa and tall fescue single and mixed plants cultivation. *Soils Sediments* 13: 925–931. doi:10.1007/s11368-012-0618-6.

Liao C, Xu W, Lu G, Deng F, Liang X 2016. Biosurfactant-enhanced phytoremediation of soils contaminated by crude oil using maize (*Zea mays*. L). *Ecological Engineering* 92: 10–17. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.03.041.

Lichtenthaler HK 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350–382.

Lin WC, Chang-Chien GP, Kao CM, Newman L, Liu JK 2013. Biodegradation of Polychlorinated Dibenzo-*p*-Dioxins by *Pseudomonas mendocina* Strain NSYSU. *Environmental Quality* 43: 349-357.

Liste HH, Alexander M 2000. Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil. *Chemosphere* 40: 11-14.

Liu SL, Luo YM, Cao ZH, Wu LH, Ding KQ, Christie P 2004. Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environmental Geochemistry and Health* 26: 285-293.

Losi ME, Amrhein C, Frankenberger WT 1994. Environmental biochemistry of chromium. Review of Environmental Contamination and Toxicology 136: 91-121.

Lu YF, Lu M 2015. Remediation of PAH-contaminated soil by the combination of tall fescue, arbuscular mycorrhizal fungus and epigeic earthworms. Hazardous Materials 285: 535-541.

Lu YF, Lu M, Peng F, Wan Y, Liao MH 2014 Remediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil by using a combination of ryegrass, arbuscular mycorrhizal fungi and earthworms. Chemosphere 106: 44–50.

Lunney AI, Zeeb BA and Reimer KJ 2004. Uptake of Weathered DDT in Vascular Plants: Potential for Phytoremediation. Environmental Science and Technology 38: 6147-6154.

Macek T, Macková M, Kás J 2000. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. Biotechnology Advances 18: 23-34.

Mackay D, Shiu WY, Ma KC 1992. Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Vol I. Monoaromatic hydrocarbons, chlorobenzenes and PCBs. Chelsea: Lewis Publishers. 704 pages.

Mandal PK 2005. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. Comparative Physiology B Biochemistry Systeme Environmental Physiology 175: 221–30.

Manickam N, Bajaj A, Saini HS, Shanker R 2012. Surfactant mediated enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane HCH isomers by *Sphingomonas* sp. NM05. Biodegradation 23: 673–682.

Marschner P, Yang C, Lieberei R, Crowley DE 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. Soil Biology & Biochemistry 33: 1437–1445.

Martin LA, Wilson DT, Reuhl KR, Gallo MA, Klassen CD 2012. Polychlorinated biphenyl congeners that increase the glucuronidation and biliary excretion of thyroxine are distinct from the congeners that enhance the serum disappearance of thyroxine. Drug Metab. Dispos. 40: 588–595.

McKay G 2002. Dioxin characterisation, formation and minimisation during municipal solid waste (MSW) incineration: review. *Chemical Engineering* 86: 343–368.

McNamara NP, Black HIJ, Beresford NA, Parekh NR 2003. Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. *Applied Soil Ecology* 24: 117–132.

McNear Jr DH 2013. The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. *Nature Education Knowledge* 4:1

Middleton EL, Rihardson S, Koziol L, Palmer CE, Yermakov ZY, Henning JA, Schultz PA, Bever JD 2015. Locally adapted arbuscular mycorrhizal fungi improve vigor and resistance to herbivory of native prairie plant species. *Ecosphere* 6:1–16. doi:10.1890/ES15-00152.1.

Morales L, Dachs J, Gonzalez-Gaya B, Hernan G, Abalos M, Abad E 2014. Background concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in the global oceanic atmosphere. *Environmental Science Technology* 48: 10198–207. doi:10.1021/es5023619.

Mori T, Kondo R 2002. Oxidation of dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and diphenyl ether by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. 60: 200-205 *Applied Microbiology Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-002-1090-9.

Mouhamadou B, Puissant J, Personeni E, Theveniau M, Kastl EM, Schloter M, Zinger L, Roy J, Geremia RA, Lavorel S 2013. Effects of two grass species on the composition of soil fungal communities. *Biology and Fertility of Soils* 49: 1131–1139. doi:10.1007/s00374-013-0810-x.

Mulligan C N 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution* 133: 183–198. doi:10.1016/j.envpol.2004.06.009.

Muratova A, Golubev S, Wittenmayer L, Dmitrieva T, Bondarenkova A, Hirche F, Merbach W, Turkovskaya O 2009a. Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene on root exudation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Environmental and Experimental Botany* 66, 519-521.

Muratova A, Pozdnyakova N, Golubev S, Wittenmayer L, Makarov O, Merbach W Turkovskaya O 2009b. Oxidoreductase activity of sorghum root exudates in a phenanthrene-contaminated environment. *Chemosphere* 74: 1031-1036.

Mustafa G, Randoux Tisserant B, Fontaine J, Magnin-Robert M, Lounès-Hadj Sahraoui A 2016. Phosphorus supply, arbuscular mycorrhizal fungal species, and plant genotype impact on the protective efficacy of mycorrhizal inoculation against wheat powdery mildew. *Mycorrhiza* 26: 685–697.

Nacke H, Thürmer A, Wollherr A, Will C, Hodac L, Herold N, Schöning I, Schrumpf M, Daniel R 2011. Pyrosequencing-Based Assessment of Bacterial Community Structure Along Different Management Types in German Forest and Grassland Soils. *PLoS ONE* 6:e17000. doi: 10.1371/journal.pone.0017000.

Nadimi M, Stefani FOP, Hijri M 2016. The large (134.9 kb) mitochondrial genome of the glomeromycete *Funneliformis mosseae*. *Mycorrhiza* 26: 747–755. doi:10.1007/s00572-016-0710-7.

Nakamiya K, Furuichi T, Ishii K 2003. Evaluation of the optimal washing conditions for dioxin-contaminated soils from the circumference of an incinerator. *Material Cycles Waste Management* 5: 63–68. doi:10.1007/s101630300010.

Nakamiya K, Hashimoto S, Ito H, Edmonds JS, Yasuhara A, Morita M 2005. Degradation of dioxins by cyclic ether degrading fungus, *Cordyceps sinensis*. *FEMS Microbiology Letters* 248: 17–22.

Nam IH, Kim YM, Schmidt S, Chang YS 2006. Biotransformation of 1,2,3-tri- and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas wittichii* RW1. *Applied Environmental Microbiology* 72:112-116.

Nasr MI, Hassan HA, Hamza HA, El-Absawy ESE, Omar MA 2012. Cloning and Expression of Three Extradiol Dioxygenases genes Type I from the Unique Dioxin Degradation *Sphingomonas Wittichii* RW1. *Journal of American Science*; 8: 40-45.(ISSN: 1545 1003).

Nwoko CO 2014. Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on the physiological performance of *Phaseolus vulgaris* grown under crude oil contaminated soil. *Journal of Geoscience and Environment Protection* 2: 9-14.

Oehl F, Jansa J, Ineichen K, Mäder P, Heijden MVD, 2011. Champignons mycorhiziens arbusculaires, bioindicateurs dans les sols agricoles suisses. *Recherche Agronomique Suisse* 2: 304-311.

Page CA, Bonner JS, Kanga SA, Milles MA, Aateurieth 1999. Biosurfactant solubilization of polycyclic-aromatic hydrocarbons, *Environmental Engineering Science* 16: 465-474.

Parra JL, Guinea J, Manresa MA, Robert M, Mercadé ME, Comelles F, Bosch MP 1989. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 66: 141-145.

Parsons JR, Storms MCM 1989. Biodegradation of chlorinated dibenzo-para-dioxins in batch and continuous cultures of strain JB1. *Chemosphere* 19: 1297-1308.

Pei XH, Zhan XH, Wang SM, Lin YS, Zhou LX 2010. Effects of a Biosurfactant and a synthetic surfactant on phenanthrene degradation by a *Sphingomonas* strain. *Pedosphere* 20: 771–779.

Peiffer JA, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangl JL, Buckler ES, Ley RE 2013. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 6548–6553.

Peng, R, Xiong A, Xue Y, Fu X, Gao F, Zhao W 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x.

Phillips JM, Hayman DS 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158–IN18. doi:10.1016/S0007-15367080110-3.

Pilon-Smits, E 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 15-39.

Pivato B, Mazurier S, Lemanceau P, Siblot S, Berta G, Mougél C, van Tuinen D 2007. Medicago species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytologist* 176: 197–210. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02151.x

Poirel J, Joulian C, Leyval C, Billard P 2013. Arsenite-induced changes in abundance and expression of arsenite transporter and arsenite oxidase genes of a soil microbial community. *Research in Microbiology* 164: 457–465.

Popat SC, Deshusses MA, 2011. Kinetics and inhibition of reductive dechlorination of trichloroethene, cis-1,2-dichloroethene and vinyl chloride in a continuously fed anaerobic biofilm reactor, *Environmental Science Technology* 45: 1569–1578.

Poremba K, Gunkel W, Lang S, Wagner F 1991. Toxicity testing of synthetic and biogenic surfactants on marine microorganisms. *Environmental Toxicology Water Quality* 6: 157–163.

Pradhan SP, Conrad JR, Paterek JR, Srivastava VJ 1998. Potential of phytoremediation for treatment of PAHs in soil at MGP sites. *Soil Contamination* 7: 467–480.

Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNEU) 2005: Outil spécialisé (Toolkit) pour l'identification et la quantification des rejets de dioxines et des furannes – 2ème édition Préparé par le PNUE substances chimiques – Genève, Suisse 88.

Puglisi E, Pascazio S, Suci N, Cattani I, Fait G, Spaccini R, Crecchio C, Piccolo A, Trevisan M 2013. Rhizosphere microbial diversity as influenced by humic substance amendments and chemical composition of rhizodeposits. *Journal of Geochemical Exploration* 129: 82–94. doi: 10.1016/j.gexplo.2012.10.006.

Qin H, Brookes PC, Xu J 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae alter soil bacterial community and enhance polychlorinated biphenyls dissipation. *Frontiers in Microbiology* 7: 1–10. doi:10.3389/fmicb.2016.00939.

Qin H, Brookes PC, Xu JM, Feng YZ 2014. Bacterial degradation of Aroclor 1242 in the mycorrhizosphere soils of zucchini (*Cucurbita pepo* L.) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Environmental Science Pollution* 21 : 12790–12799.

Rabie GH 2005. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of soil rhizosphere spiked with poly aromatic hydrocarbons. *Mycobiology* 33: 41-50.

Rahman KSM, Banat IM, Thahira J, Thayumanavan T, Lakshmanaperumalsamy P 2002. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technology* 81: 25–32.

Rajtor M, Piotrowska-Seget Z 2016. Prospects for arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to assist in phytoremediation of soil hydrocarbon contaminants. *Chemosphere* 162: 105-116

Ranjard L, Poly F, Combrisson J, Richaume A, Gourbière F, Thioulouse J, Nazaret S 2000. Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microbial Ecology* 39: 263–272.

Rasche F, Knapp D, Kaiser C, Koranda M, Kitzler B, Zechmeister-Boltenstern S, Richter A, Sessitsch A 2011. Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. *ISME J* 5: 389–402.

Redecker D, Kodner R, Graham LE 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 192-1921.

Reilley KA, Banks MK, Schwab AP 1996. Organic chemicals in the environment: dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere, *Journal of Environmental Quality* 25: 212-219.

Rezek J, Macek T, Mackova M, Triska J 2007. Plant metabolites of polychlorinated biphenyls in hairy root culture of black nightshade *Solanum nigrum* SNC-90. *Chemosphere* 69: 1221–1227.

Richter DD, Oh NH, Fimmen R, Jackson J 2007. The rhizosphere and soil formation. hydrodictyon.eeb.uconn.edu

Rillig MC, Wright SF, Nichols KA, Schmidt WF, Torn MS 2001. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant Soil* 233: 167-177.

Ritter L, Solomon KR, Forget J, Stemeroff M, O’Leary C 1996. Les polluants organiques persistants. Le Programme international sur la sécurité des substances chimiques (PISSC), Programme interorganisations de gestion écologiquement rationnelle des produits chimiques (IOMC).

Rousk J, Baath E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Knight R, Fierer N 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J* 4:1340–1351.

Rowe HI, Brown CS, Claassen VP 2007. Comparisons of mycorrhizal responsiveness with field soil and commercial inoculum for six native montane species and *Bromus tectorum*. *Restoration Ecology* 15:44–52.

Ruiz-lozano JM 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* 13: 309–317. doi:10.1007/s00572-003-0237-6.

Sahle-Demessie E, Grosse DW, Bates ER 2000. Solvent extraction and soil washing treatment of contaminated soils from wood preserving sites: Bench-scale studies. United States Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, 25 p

San Miguel A 2011. Phytoremediation des organochlorés. Etude mécanistique et fonctionnelle des capacités épuratrices du système plante-rhizosphère.

Sawerysyn JP, Visez N 2003. Les dioxins une famille particulier de polluants organiques persistants.

Sawulski P, Clipson N, Doyle E 2014. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on microbial community structure and PAH ring hydroxylating dioxygenase gene abundance in soil. *Biodegradation* 25: 835–847. doi: 10.1007/s10532-014-9703-4

Schäffner A, Messner B, Langebartels C, Sandermann H 2002. Genes and enzymes for In-Planta phytoremediation of air, water and soil. *Acta Biotechnologica* 22: 141–152.

Schamfuß S, Neu TR, van der Meer JR, Tecon R, Harms H, Wick LY 2013. Impact of mycelia on the accessibility of fluorene to PAH-degrading bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6908–6915. 10.1021/es304378d.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Horn DJ, Van Weber CF 2009. Introducing mothur: open source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7537-7541. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01541-09>.

Schnoor JL, Light LA, McCutcheon SC, Wolfe NL, Carreia LH 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science and Technology* 29: 318A-323A.

Schreiner G, Wiedmann T, Schimmel H, Ballschmiter K 1997. Influence of the substitution pattern on the microbial degradation of mono- to tetrachlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Chemosphere* 34: 1315-1331.

Schüßler A, Schwarzott D, Wakler C 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota : phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421.

Secher C, Lollier M, Jezequel K, Cornu JY, Amalric L, Lebeau T 2013. Decontamination of a polychlorinated biphenyls-contaminated soil by phytoremediation-assisted bioaugmentation. *Biodegradation*. 24: 549–562.

Shann JR, Boyle J. 1994 Influence of plant species on in situ rhizosphere degradation. *Bioremediation through Rhizosphere Technology* 563: 70–81.

Shannon CE, Weaver W 1963. University of Illinois Press.

Shimp JF., Tracy JC, Davis LC, Lee E, Huang W, Erickson LE, Schnoor JL 1993. Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 23: 41 - 77.

Shreiner RP, Mihara KL, Mc Daniel H, Benrhlenfalvay GJ 1997. Mycorrhizal fungi influence plant and soil functions and interactions. *Plant and soil* 188: 199-209.

Singer AC, Crowley DE, Thompson IP 2003. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends Biotechnology* 21: 123–130.

Singh BK, Dawson LA, McDonald CA, Buckland SM 2009. Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *Applied Soil Ecology* 41: 239-248.

Slater H, Gouin T, Leigh MB 2011. Assessing the potential for rhizoremediation of PCB contaminated soils in northern regions using native tree species. *Chemosphere* 84: 199–206.

Smidt H, de Vos WM 2004. Anaerobic microbial dehalogenation. *Annual Review of Microbiology* 58: 43-73.

Smith SE, Read DJ 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd edn. Academic, New York.

Stanmore BR 2004. The formation of dioxins in combustion systems. *Combustion and Flame* 136: 398–427.

Sterckeman T, Ouvrard S, Leglize P 2012. *Phytoremédiation des sols. Dossiers techniques de l'ingénieur*, Edition T.I., Centre de documentation Brabois.

Straube WL, Jones-Meehan J, Pritchard PH, Jones WR 1999. Bench-scale optimization of bioaugmentation strategies for treatment of soils contaminated with high molecular weight polyaromatic hydrocarbons. *Resources, Conservation and Recycling* 27: 27–37.

Sulistyaningdyah WT, Ogawa J, Li QS, Shinkyō R, Sakaki T, Inouye K, Schmid RD, Shimizu S 2004. Metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by cytochrome P450BM-3 and its mutant. *Biotechnology Letters*. 26: 1857–1860. doi:10.1007/s10529-004-5317-y.

Sutton NB, Maphosa F, Morillo JA, Abu Al-Soud W, Langenhoff AA, Grotenhuis T, Rijnaarts HH, Smidt H 2013. Impact of Long-Term Diesel Contamination on Soil Microbial Community Structure. *Applied Environmental Microbiology* 79: 619–630. doi: 10.1128/AEM.02747-12.

Syndicat Mixte de l'Arrondissement d'Avesnes (SMIAA) 2014. Rapport d'exercice sur le prix et la qualité du service public sur le traitement par incinération des déchets ménagers et assimilés.

Tabatabai MA 1982. Soil enzymes. In *Methods of Soil Analysis. II. Chemical and Microbiological Properties*, eds A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeney, 2nd edn., pp. 903-947. American Society of Agronomy, Madison.

Takada S, Nakamura M, Matsueda T, Kondo R, Sakai K 1996. Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white root fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Applied Environmental Microbiology* 62: 4323-4328.

Tarlera S, Jangid K, Ivester AH, Whitman WB, Williams MA 2008. Microbial community succession and bacterial diversity in soils during 77,000 years of ecosystem development. *FEMS Microbiology Ecology* 64: 129-140.

Tawaraya K, Naito M, Wagatsuma T 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by hyphal exudates of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Nutrition* 29: 657–665. doi: 10.1080/019041606005 64428

Tchabi A, Coyne D, Hountondji F, Lawouin L, Wiemken A and Oehl F 2010. Efficacy of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi for promoting white yam (*Dioscorea rotundata*) growth in West Africa. *Applied Soil Ecology* 45: 92-100.

Teng Y, Luo Y, Sun X, Tu C, Xu L, Lui W, Li Z, Christie P 2010. Influence of Arbuscular Mycorrhiza and Rhizobium on Phytoremediation by Alfalfa of an Agricultural Soil Contaminated with Weathered PCBs: A Field Study. *International Journal of phytoremediation* 12: 516-533. doi:10.1080/15226510903353120.

Tissut M, Raveton M, Ravanel P 2006. Ecoremediation. Cooperation between plants and soil microorganisms, molecular aspects and limits, pp. 489-504.

Toljander JF, Lindahl BD, Paul LR, Elfstrand M, Finlay RD 2007. Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. *FEMS Microbiology Ecology* 61, 295–304. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00337.x.

Trabelsi D, Mhamdi R 2013. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. *Biomed Research International* 2013: 1–11. doi:10.1155/2013/863240.

Trejo D, Moreira C, Banuelos I, Lara L, Alafita G, Reyes A 2013. Effect of diesel and biodiesel on the growth of *Brachiaria decumbens* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Tropical and Subtropical Agroecosystem* 16: 391-398.

Tuppurainen K, Halonen I, Ruokojarvi P, Tarhanen J, Ruuskanen J 1998. Formation of PCDDs and PCDFs in municipal waste incineration and its inhibition mechanisms: a review. *Chemosphere* 36: 1493–1511.

Turnau K, Haselwandter K 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi: an essential component of soil microflora in ecosystem restoration. S. Gianinazzi, H. Schuepp (Eds.). *Mycorrhizal Technology: from Genes to Bioproducts*, Birkhauser, Basel, pp. 137–149

Urbaniak M 2013. Biodegradation of PCDDs/PCDFs and PCBs. *Biodegradation Engineering and Technology* 73–100. doi:10.5772/56018.

Urbaniak M, Wyrwicka A, Zieliński M, Mankiewicz-Boczek J 2016. Potential for phytoremediation of PCDD/PCDF-contaminated sludge and sediments using Cucurbitaceae plants: a pilot study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 97: 401–406.

Valentin L, Oesch-Kuisma H, Steffen KT, Kähkönen M, Hatakka A, Tuomela M 2013. Mycoremediation of wood and soil from an old sawmill area contaminated for decades. *J. Hazardous Materials* 260: 668–675.

Valli K, Warrishi H, Gold MH 1992. Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Bacteriology* 174: 2131-2137.

Van Aken B, Correa PA, Schnoor JL 2010. Phytoremediation of polychlorinated biphenyls: new trends and promises. *Environmental Science Technology* 44: 2767–76.

Vergani L, Mapelli F, Zanardini E, Terzaghi E, Di Guardo A, Morosini C, Raspa G, Borin S 2017. Phyto-rhizoremediation of polychlorinated biphenyl contaminated soils: An outlook on plant-microbe beneficial interactions. *Science of the Total Environment* 575: 1395–1406. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.09.218.

Verville JH, Hobbie SE, Chapin FS, Hooper DU 1998. Response of tundra CH₄ and CO₂ flux to manipulation of temperature and vegetation. *Biogeochemistry* 41: 215-235.

Vipulanandan C, Ren X 2000. Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant, *Environmental Engineering* 126: 629-634.

Viisimaa M, Karpenko O, Novikov V, Trapido M, Goi A 2013. Influence of biosurfactant on combined chemical-biological treatment of PCB-contaminated soil. *Chemical Engineering* 220: 352–359.

Volkering F, Breure AM, van Andel JG, Rulkens WH 1995. Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1699–1705.

Wang Y, Oyaizu H 2009. Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil. *Hazardous Materials* 168: 760–764. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.02.082.

Wang Y, Oyaizu H 2011. Enhanced remediation of dioxins-spiked soil by a plant-microbe system using a dibenzofuran-degrading *Comamonas* sp. and *Trifolium repens* L. *Chemosphere* 85: 1109–1114. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.028.

Weissenhorn I, Leyval C, Belgy G, Berthelin J 1995. Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy metal uptake by maize (*Zea mays* L.) in Pot Culture with contaminated soil. *Mycorrhiza* 5: 245-251.

West CC, Harwell JH 1992. Surfactant and surface remediation, *Environm. Sci. Technol* 26: 2324-2330.

Wilkes H, Wittich RM, Timmis KN, Fortnagel P, Francke W 1996. Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-p-dioxins by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Applied Environmental Microbiology* 62: 367-371.

Wilson DC 1982 Lessons from Seveso Chemistry in Britain 18: 499-504.

Wittich RM, Strompl C, Moore ERB, Blasco R, Timmis KN 1999. Interactions of sphingomonas and Pseudomonas strains in the degradation of chlorinated dibenzofurans. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23: 353-358.

Wittich RM, Wilkes M, Sinnwell V, Francke W, Fortnagel P 1992. Metabolism of dibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Applied Environmental Microbiology* 58: 1005-1010.

Wu FY, Yu XZ, Wu SC, Lin XG, Wong MH 2011. Phenanthrene and pyrene uptake by arbuscular mycorrhizal maize and their dissipation in soil. *Journal of Hazardous Materials* 187: 341-347.

Wu N, Zhang S, Huang H, Christie P 2008. Enhanced dissipation of phenanthrene in spiked soil by arbuscular mycorrhizal alfalfa combined with a non-ionic surfactant amendment. *Science of the Total Environment* 394: 230–236.

Yang S, Wen X, Zhao L, Shi Y, Jin H 2014. Crude oil treatment leads to shift of bacterial communities in soils from the deep active layer and upper permafrost along the China Russia Crude Oil Pipeline route. *Plos One* 9: e96552. doi: 10.1371/journal.pone.0096552

Yoshida N, Takahashi N, Hiraishi A 2005. Phylogenetic Characterization of a Polychlorinated-Dioxin- Dechlorinating Microbial Community by Use of Microcosm Studies. *Applied and environmental microbiology* 71: 4325–4334. doi:10.1128/AEM.71.8.4325.

Yu XZ, Wu SC, Wu FY, Wong MH 2011. Enhanced dissipation of PAHs from soil using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. *Journal of Hazardous Materials* 186: 1206–1217.

Zambon P, Ricci P, Bovo E, Casula A, Gattolin M, Fiore AR, Chiosi F, Guzzinati S 2007. Sarcoma risk and dioxin emissions from incinerators and industrial plants: a population-based case-control study (Italy). *Environmental Health* 6: 1–10. doi:10.1186/1476-069X-6-19.

Zeng G, Liu Z, Zhong H, Li J, Yuan X, Fu H, Ding Y, Wang J, Zhou M 2011. Effect of monorhamnolipid on the degradation of n-hexadecane by *Candida tropicalis* and the association with cell surface properties. *Applied Microbiology Biotechnology* 90: 1155–1161

Zhang C, Yin L, Dai S 2009. Diversity of root-associated fungal endophytes in *Rhododendron fortune* in subtropical forests of China. *Mycorrhiza* 19: 417–423.

Zhang J, Yin R, Lin X, Liu W, Chen R, Li X 2010. Interactive effect of biosurfactant and microorganism to enhance phytoremediation for removal of aged polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental Health* 56: 257–266.

Zhang XF, Zhao L, Xu SJ Jr, Liu YZ, Liu HY, Cheng GD 2013. Soil moisture effect on bacterial and fungal community in Beilu River (Tibetan Plateau) permafrost soils with different vegetation types. *Applied Microbiology* 114: 1054–1065.

Zhang XH, Zhu YG, Lin AJ, Chen BD, Smith SE, Smith FA 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi can alleviate the adverse effects of chlorothalonil on *Oryza sativa* L. Chemosphere 64: 1627-1632.

Annexe

Valorisation

Communications orales

Communications internationales

- **Meglouli H.**, Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A. Phytoremediation assisted by arbuscular mycorrhizal fungi to clean-up dioxins/furan polluted soil of Halluin site. Congrès-Exposition international sur les sols, les sédiments et l'eau (Intersol), 20 Mars 2014 à Lille, France.

- **Meglouli H.**, Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A. Arbuscular mycorrhizae efficiency in dissipation of dioxins/furans from aged-polluted soil: a microcosm experiment. 12th International Phytotechnology Conference, 27-30 September 2015 à Manhattan, Kansas (USA).

- **Meglouli H.**, Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A. Phytoremediation assisted by arbuscular mycorrhizal fungi to clean-up dioxins/furans polluted soil: a microcosm experiment. Congrès-Exposition international sur les sols, les sédiments et l'eau (Intersol), 16 Mars 2016 à Lille, France.

- **Meglouli H.**, Magnin-Robert M., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A. Effect of plant mycorrhization on the rhizospheric microbiome structure in a context of polluted soils. 12th EFPP (European Foundation for Plant Pathology) & 10th SFP (French Society for Plant Pathology), 30 Mai 2017 à Dunkerque, France.

Communications nationales

- **Meglouli H.**, Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A. Bilan du projet "dioxines : contamination et biodegradation-première phase". 27 Mai 2013 à Halluin, France.

- **Meglouli H.**, Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A. Bilan du projet "dioxines : contamination et biodegradation-Deuxième phase". 21 Novembre 2014 à Halluin, France.

- **Meglouli H.**, Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A. Bilan du projet "dioxines : contamination et biodegradation-Deuxième phase". 03 Juillet 2015 à La Madeleine, France.

- **Meglouli H.**, Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A. Efficacité des champignons mycorrhiziens à arbuscules dans la dissipation des sols historiquement pollués par les dioxins/furanes. 14 Décembre 2015. Séminaire doctorant UCEIV, Calais, France.

Communications par affiche

Communications internationales

- **Meglouli H.**, Fontaine J., Labidi S., Tisserant B., Laruelle F., Lounès-Hadj Sahraoui A. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of dioxins/furans polluted soils. Congrès International sur les Mycorhizes, 16 Octobre 2014 à Marrakech, Maroc.

- **Meglouli H.**, Fontaine J., Changey F., Magnin-Robert M, Lounès-Hadj Sahraoui A. La phytoremédiation assistée par les champignons mycorhiziens à arbuscules pour dépolluer des sols historiquement pollués par les dioxines/furanes. SFR Condorcet. 05-06 Juillet 2016, Gembloux, Belgique.

Communications nationales

- **Meglouli H.**, Fontaine J., Labidi S., Tisserant B., Laruelle F., Lounès-Hadj Sahraoui A. Une association entre des champignons et des plantes pour dépolluer des sols contaminés par les dioxines. Seconde Journées Franco-Libanaises (JFL2), 23 Octobre 2013 à Dunkerque, France.

- **Meglouli H.**, Fontaine J., Laruelle F., Caria G, Richard A, Lounès-Hadj Sahraoui A. Intérêt des mycorhizes dans la phytoremédiation des sols historiquement contaminés par les dioxines du site d'Halluin. Gestion et requalification durable des sites et sols dégradés. 26 septembre 2014 à Lille, France.

- **Meglouli H.**, Lounès-Hadj Sahraoui A., Laruelle F., Fontaine J. Apport de l'inoculation mycorhizienne dans la phytoremédiation des sols historiquement pollués par des rejets de dioxines/furanes issus d'un incinérateur. Institut de Recherche en Environnement Industriel (IRENI), 03 Octobre 2014 à Dunkerque, France.

- Lounès-Hadj Sahraoui A., Lenoir I, **Meglouli H.**, Calonne M., Debiane D., Verdin A., Fontaine J. Les mycorhizes : un outil de phytoremédiation et de gestion des sols pollués. 3ème rencontres nationales de la recherche sur les sites et sols pollués, 18-19 novembre 2014, Paris, France.

Résumé

Célèbres depuis l'accident de Seveso en 1976, les dioxines/furanes (PCDD/F) restent, malgré une forte baisse de leurs émissions, un sujet de préoccupation permanent en France et dans le monde. La rémanence de ces composés organochlorés dans le sol et le risque toxique qu'ils représentent pour l'Homme et l'environnement font que la gestion et la remédiation des sols contaminés par les PCDD/F sont devenues une priorité des industriels, législateurs et scientifiques. La phytoremédiation compte parmi les méthodes émergentes de dépollution des sols contaminés en raison de son adéquation avec le développement durable. Elle combine les capacités naturelles des plantes et de leur microbiote rhizosphérique à biodégrader les polluants organiques. Cependant, l'efficacité de cette phytotechnologie est encore souvent limitée, en particulier lorsqu'il s'agit de composés chlorés, à cause de leur récalcitrance, leur phytotoxicité et leur faible biodisponibilité dans le sol. Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse a consisté à étudier les performances de la phytoremédiation assistée, en particulier par les champignons mycorhiziens arbusculaires, d'un sol agricole historiquement pollué par les PCDD/F prélevé sur une parcelle expérimentale située à proximité d'un ancien incinérateur. L'ensemble des résultats obtenus mettent en évidence, en particulier, le potentiel de deux espèces végétales, la luzerne et la fétuque, dans la rhizodégradation des PCDD/F. La végétalisation du sol permet de moduler les communautés microbiennes du sol (bactéries, Archées et champignons) et notamment celles qui semblent impliquées dans la dissipation des PCDD/F. En revanche, bien que la mycorhization agisse sur les communautés microbiennes du sol, celle-ci n'a pas eu d'impact, dans nos conditions expérimentales, sur la dissipation des PCDD/F quelles que soit l'origine de l'inoculum utilisé et les espèces mycorhiziennes qui le compose. La dégradation de ces composés organochlorés est plus marquée dans un sol préalablement stérilisé, puis recolonisé par certaines communautés microbiennes spécifiques, impliquées dans la dissipation des PCDD/F. L'utilisation combinée d'un mélange de rhamnolipides avec l'introduction dans le sol d'une bactérie, *Sphingomonas wittichii* RWI, décrite pour ses capacités de dégradation des PCDD/F, permet d'accroître l'efficacité de la rhizodégradation des PCDD/F qui se traduit par une baisse significative de la cytotoxicité du sol après phytoremédiation.

Mots clés : dioxines, furanes, phytoremédiation assistée, champignons mycorhiziens arbusculaires, communautés microbiennes, Illumina MiSeq.

Abstract

Famous since the Seveso accident in 1976, dioxins/furans (PCDD/F) remain, despite a sharp decline in emissions, a subject of permanent concern in France and in the world. The remanence of these organochlorinated compounds in soil and the toxic risk they represent for humans and the environment mean that the management and remediation of PCDD/F contaminated soil has become a priority for industrialists, legislators and scientists. Phytoremediation is one of the emerging depollution methods of contaminated soils due to its suitability for sustainable development. It combines the natural capacities of plants and their rhizospheric microbiota to biodegrade organic pollutants. However, the effectiveness of this phytotechnology is still often limited, especially in the case of chlorinated compounds, due to their recalcitrance, phytotoxicity and low bioavailability in the soil. Thus, the thesis aims to study the performance of assisted phytoremediation, in particular by mycorrhizal fungi, of an agricultural PCDD/F aged-polluted soil from an experimental plot near an old incinerator. The results obtained show the potential of two plant species, alfalfa and tall fescue, in the rhizodegradation of PCDD/F. Soil vegetation allows to modulate soil microbial communities (bacteria, archaea and fungi) including those that appear to be involved in the dissipation of PCDD/F. On the other hand, although mycorrhization affects soil microbial communities, it has not had any impact on the dissipation of PCDD/F in our experimental conditions, whatever the inoculum origin and the mycorrhizal species which compose it. The degradation of these organochlorinated compounds is more significant in a previously sterilized soil and then recolonized by specific microbial communities involved in the PCDD/F dissipation. The combined use of rhamnolipids mixture and *Sphingomonas wittichii* RWI bacterium described for its degradation capabilities of PCDD/F makes it possible to increase the efficiency of PCDD/F rhizodegradation which results in a significant decrease in soil cytotoxicity after phytoremediation.

Keywords: dioxins, furans, assisted phytoremediation, arbuscular mycorrhizal fungi, microbial communities, Illumina MiSeq.