

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

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 codirecteur 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, Maitre 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.

- 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 découvir 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 « mégaexpériences » 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 inombrables.

Je tiens à remercie 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.

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 malgrè 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 de	s abréviations	i
Liste de	s figures hors publications	ii
Liste de	s tableaux hors publications	iii
Introdu	ction générale	1
	Partie I. Synthèse bibliographique	
I.Dioxin	es et Furanes	4
I.1.	Définition	4
I.2.	Caractéristiques physico-chimiques	5
I.3.	Les principales sources de PCDD/F	6
1.3.	1. Procédés thermiques	7
1.3.	2. Procédés chimiques industriels	8
1.4.	Comportement des PCDD/F dans les sols	8
1.5.	La toxicité des PCDD/F	9
1.6.	Contexte réglementaire de la gestion des sites et sols pollués par les PCDD/F	11
II. La	a 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	2.1. Phytoremédiation assistée	16
I	II.2.1.1. Phytoremédiation assistée par les CMA	16
I	II.2.1.2. Phytoremédiation assistée par l'ajout de biosurfactants	20
I	II.2.1.3. Introduction des microorganismes à capacité dégradante	22
III. E	Biodégradation des PCDD/F par les microorganismes du sol	23
III.1.	Généralités	23
III.2.	Dégradation des PCDD/F en condition aérobie	23
111.2	2.1. Implication des bactéries	23
111.2	2.2. Implication des champignons saprotrophes	26
III.3.	Dégradation des PCDD/F en conditions anaérobies	28
IV. L	a 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 PCCD/F (publication 1, partie 3).	12
3.2. Expérimentation 2 : Influence de l'origine de l'inoculum mycorhizien sur la phytoremédiation des sols pollués par les PCDD/F (publication2, partie 3)	13
3.3. Expérimentation 3 : optimisation des conditions de phytoremédiation des sols pollués par les PCDD/F (publication 3, partie 3)	; 14
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	16
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	16
5.2. Extraction et quantification des PCDD/F dans le matériel végétal	17
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)	18
7. 2. Dosage de la déshydrogénase	19
8. Caractérisation des communautés microbiennes du sol	49
8.1. Extraction de l'ADN génomique	19
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	
Publication 2	
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 age	d 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 microbesassisted phytoremdiation 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				
СМА	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	Funneliformis mosseae				
G	Grossissement				
GC/HRMS	Gaz Chromatography/ High Resolution Mass Spectrometry				
НАР	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
Kow	Coefficient de partage Octanol / Eau
LDH	Lactate Deshydrogénase
LMCU	Lille Métropole Communauté Urbaine
MDH	Mitochondrial Dehydrogenase
MW	Mégawatt
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ΟΤυ	Operational Taxonomic Unit
РСВ	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

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)*

Figure14 :Schémasd'ajoutd'unterminateurréversible(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 lesmammifères, 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 stérilisationaux 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 PCRpourleséquençage.

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 PCCD/F dans l'atmosphère reste 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 (Eppe 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 TCCD (appelée aussi « dioxine Seveso »), seule dioxine classée par le centre international de recherche sur le cancer comme substance « cancérogène 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

principal objectif l'investigation du potentiel des mycorhizes dans la phytoremédiation et la gestion d'un sol historiquement pollué par les PCCD/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	$Cl_{x} = \frac{2}{4} + \frac{1}{0} + \frac{9}{6} + \frac{8}{7} + Cl_{y}$	
		2378-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
Furanes	$Cl_{x} \xrightarrow{2}{4} \xrightarrow{0}{6} \xrightarrow{7} Cl_{y}$	
		2378-tétrachlorodibenzofurane

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
Prófivo	mono	di	tri	tétra	penta	hexa	hepta	octa	
Trenxe	Μ	D	Tr	Т	Pe	Hx	Нр	0	
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.

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	entaCDD 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

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

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

Partie – I – Synthèse bibliographique

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 cancérogène du groupe I qui correspond au groupe des agents cancérogènes 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) entrainant 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-hydrocarbone). Le récepteur Ah est présent dans de nombreux tissus d'espèces appartenant au règne animal.

Les PCDD/F les plus toxique 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 2378-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 :

Concentration en TEQ = Σ 1-17 (TEF x concentration massique du PCDD/F)

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 lesmammifères, 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 première difficultées rencontrées aujourd'hui est qu'il n'y a pas de règlementation 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

Partie – I – Synthèse bibliographique

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 <u>http://www.thierry-guicherd.fr/Blog/en/sciences/109-la-biotechnologie-vegetale-est-une-filiere-d-avenir</u>).

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 ellemême, 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 PCCD/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 rhizosphèriques 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-évolués 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 biodégrédation des polluants soit de façon directe par les racines associées aux hyphes mycorhiziens ou de façon indirecte par la stimulation des microorganismes rhizosphèriques 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 entrainé 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 accroit 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 (sècheresse, 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 superoxide 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 décroit 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 cométabolisme 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 PCCD/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 monoxygénation 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 Rhodococus (Actinobacteria), Beijerinckia, Sphingomonas, Brevundimonas (Alphaproteobacteria), **Bacillus** (Bacilli), Alcaligenes, Burkholderia, Ralstonia (Betaproteobacteria) et Klebsiella, Lysobacter, Pseudomonas et Pseudoxanthomonas (Gammaproteobacteria) (Shreiner 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-pdioxine 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-methoxyhydroquinone

(8), 4-hydoxy-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 obtenu 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 déshalogénation réductrice) est une réaction d'oxydoréduction 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 : $RCI + H^+ + 2e^-$ = $RH + CI^-$ (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 polychlorées 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 déhalorespirantes 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 déshalogénation 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 *Dehaloccocoides ethenogenes* souche 195 (Fennell et al., 2004), soit en position *péri* formant la 123-TCDD avec *Dehaloccocoides* sp. souche CBDB1 (Bunge et al., 2003). Ces produits peuvent à leur tour subir des déchlorations 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); Peridéchloration adjacente avec un chlore vicinal (P1); Peri-déchloration sans chlore vicinal (P0); Réactions prédominantes de déchloration effectuées par *Dehalococcoides sp*. CBDB1 (CDDB1); 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 entraine 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 (Golebiewski 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 croitre 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 entrainait des modifications au sein des communautés, avec notamment l'extinction de bactéries extrêmophiles. 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 praires 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 mophologiques (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**).
- 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**).
- 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	
рН	6,42	6,34	
Calcaire (CaCO3) total (g/kg)	<1	<1	
Phosphore (P2O5) (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)	$14 \pm 1,2$	15 ± 0,9	



Partie – II – Matériels et Méthodes

0 2378-TCDF

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 PCCD/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'éclairement 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 boite 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 3,2 10⁸ 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

Partie – II – Matériels et Méthodes

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

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 :

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 ajouté 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'éclairement 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 200µL. 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 = Σ 1-17 (TEF x 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.
Congénère	Concentration en	TEF (OMS 2005)	Concentration en
	ng/kg		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

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

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 :

[échantillon dopé *mesuré*]- [échantillon non dopé *mesuré*] *100 = Rendement % [Teneur théorique en « Dioxines » de l'échantillon dopé]

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] μ g/ml = 12,25 x A₆₆₃ – 2,79 x A₆₄₇ = Ca; [Chlb] μ g/ml = 21,50 x A₆₄₇ – 5,10 x A₆₆₃ = Cb; [Car] μ g/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°Cet à l'obscurité, le triphenylformazan(TPF) est extrait 3 fois dans10 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 extrait 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 a 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'élution 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-ITTM 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 à 0 à 50 ng d'ADN/mL est ajouté à la plaque et la fluorescence de l'ensemble de la plaque est mesuré à l'aide du StepOne TM Real-Tme PCR system (excitation 485, émission 517 nm). Une courbe des standards ADN est tracé 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 amplifiés 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.

Communauté	Gènes	Amorces	Séquences 5'-3'	Programmes	
Bactérie	ARN 16S	341F	CCT ACG GGN GGC WGC AG		
	Région V3-V4	805R	GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC	94°C, 2 min (1 cvcle)	
	ARN 16S	517F	GCY TAA AGS RNC CGT AGC		
Archée	Région V4-V5	909R	TTT CAG YCT TGC GRC CGT	94°C, 34s, 55°C, 30 sec; 72°C, 30	
		ITS1F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	min (30 cycles)	
Champignon	ITS1	58A2R	CTG CGT TCT TCA TCG AT	mm (50 cycles)	

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

8.2.2. Illumina sequencing

des produits d'amplification PCR (16S ARN bactérien et Le séquençage archaebactérien, ITS1 fongique) pour l'analyse des communautés microbiennes des expérimentations en microcosmes a été réalisé par Ilumina 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'enchainement 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 (<u>http://www.illumina.com</u>)





8.3 Analyses bioinformatiques

L'étude des données brutes issues du séquençage en Illumina ont été travaillées suivant méthodologie décrite dans le projet « Brazilian Microbiome Project » (2014) une (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 (version13.34.4) selon la démarche décrite par Schloss et al. (2009) et QIIME (version 1.9.1) (Quantitative Insignts 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 lnS (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

Partie – II – Matériels et Méthodes

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 PCCD/F a été utilisé, cet extrait en réalisant une exposition de 48h afin d'évaluer leur éventuelle toxicité par l'intermédiaire de deux activité 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 été ensemencées 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, vegétalisation), 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, raygrass, 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,

Présentation de la publication 1

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 (B)). 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 Burkholderiales, Caulobacteriales, Elin 323, Rhizobiales, Rhodospirillales Bacillales, 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
- ² Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques,
- 8 Université de Montréal, Montréal, QC, Canada
- 9 * Correspondence: <u>lounes@univ-littoral.fr</u> (A. Lounès-Hadj Sahraoui)
- 10 Keywords: dioxin/furan, phytoremediation, mycorrhizal inoculation, sterilization, bacteria,
- 11 archaea, fungi, aged-contaminated soil
- 12 Abstract

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

30 Elin 323, Rhizobiales, Rhodospirillales and Sphingomonadales for bacterial community and

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

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 Selection of microbes by secreting specific root exudates (Bakker et al., 2012; Huang et al., 65 Selection of microbes by secreting specific root exudates (Bakker et al., 2012; Huang et al.,

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

The aim of this study was to determine the effect of different plant species (clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue, miscanthus and a mixture of plants), arbuscular mycorrhizal inoculation and soil sterilization on the structure and diversity of soil bacterial, archeal and fungal communities, and their role in the phytoremediation of aged-PCDD/F contaminated soil. Our experimental design consisted on the use of irradiated and non-irradiated polluted soils in microcosms. Soil sterilization supressed 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 contaminated site which is located at Halluin in northern France (50° 45' 53" N, 3° 7' 43" E), 106 near an old incineration plant in activity for thirty years. The polluted soil was dried, sieved to 107 2 mm and homogenized. While one fraction of the soil was sterilized by radiation (45 kGy, 108 109 gamma rays) (Ionisos company, Sablé-sur-Sarthe) to supress indigenous AMF as well as 110 other microbes, the second one was not sterilized. The physico-chemical parameters of sterilized and non-sterilized soils are presented in Table 1. Five AMF inoculated or non-111 inoculated plant species : clover (Trifolium pratense L.), alfalfa (Medicago sativa L.), 112 ryegrass (Lolium perenne L.), Tall fescue (Festuca arundinacea Schreb.), Miscanthus 113 (Miscanthus×giganteus) and commercial mixture of plant seeds (Rusti'Flore, Nova Flore, 114 Champigné, France) composed from Lavatera trimestris L., Gypsophila elegans Bieb., 115 Centaurea cyanus L., Linum grandiflorum Desf., Calendula officinalis L., Agrostemma 116 117 githago L., Cosmos bipinnatus Cav., Papaver rhoeas L. and eight species confidential were used to carry out phytoremediation microcosm experiments. The microcosms contained 118 sterilized or non-sterilized aged-polluted soil. The control microcosms were not vegetated and 119 120 contained sterilized or non-sterilized soils. Planted microcosms pot (400 mL, diameter 7.5 cm) were sown with five pre-germinated seeds of different species except Rusti'Flore and 121 122 miscanthus. Non-inoculated microcosms contained 270 g of polluted soil and 10% (w/w) of Solrhize® a commercial inoculum consisting of a mixture of Glomus sp. (Agrauxin Ltd, 123 124 France) (10 propagules/g), sterilized by autoclave (121°C during 30 minutes). Inoculated microcosms contained 270 g of the polluted soil and 10% of commercial AMF inoculum 125 Solrhize (Agrauxin Ltd, France) $(10^3 \text{ propagules/g})$. As Rusti'Flore is composed of a mixture 126 of seeds, it was cultivated in trays containing 1800 g of polluted soil and 10% of AMF 127 128 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 mycorhizal inoculum. For the sterilized soil, the indigenous micro-flora, except AMF spores, 130 was introduced by adding 10 ml per pot of non-sterile soil suspension filtered at 40 µm. The 131 132 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 ($P \le 0.05$). Values are means \pm

135 s.d. (n=3)

	Sterilized	Non-sterilized
	soil	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
$P_2O_5(g/kg)$	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±40 ^a	$185{\pm}17^{ab}$

136 Determination of plant biomass

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

143 **AMF root colonization**

After 20 weeks of culture, AMF root colonization rates were determined by microscopic observation (Olympus BX40F, Japan). To quantify AMF root colonization, fresh roots were 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 (×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

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

162 **DNA extraction**

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

168 Quant-iTTM dsDNA High-Sensitivity Assay Kit (Invitrogen)

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

179 PCR and Amplicon sequencing

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

Bioinformatic analysis

The Illumina datasets were processed as described in Brazilian Microbiome Project 193 (http://www.brmicrobiome.org/16s-profiling-pipeline-illumina) with some modifications. The 194 partial 16S rRNA gene and ITS sequences were processed in Mothur (v.1.34.4) (Schloss et 195 al., 2009) and QIIME (v.1.9.1) (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et 196 197 al., 2010). The first part of the pipeline was performed in mothur, it is composed of five steps: i) forward and reverse sequences reads were merged within the *make.contigs* command, ii) 198 trim off primers with trim.seqs command, and iii) unique.seqs command was used for remove 199 200 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 201 202 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 203 204 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 taxonomic affiliations across AMF inoculation and plant species. All Illumina MiSeq 210 211 databases generated in this study were deposited in the NCBI Sequence Read Archive and are 212 available under the project number (..)

64

213 Statistical analysis

Data were analyzed statistically by means of comparison by Mann-Whitney test using, XLSTAT 19.1. Different letters following values indicate statistically significant differences between different treatments. Data of colonization percentages were converted to arcsine values before Mann-Whitney test. Standard deviations were calculated by Microsoft Office Excel 2007 for all data. In order to relate the changes in microbial community composition to environmental variables, redundancy analysis (RDA) was used as implemented in the 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 mycorrhizal root colonizations were estimated at 28, 32, 34, 45, 51 and 66% in inoculated tall 225 fescue, alfalfa, miscanthus, clover, ryegrass and Rusti'Flore, respectively (Table 2). 226 227 Moreover, spontaneous root colonizations by indigenous AMF were observed in nonsterilized soil. The lowest mycorrhizal rate was obtained with miscanthus (42%), followed by 228 229 clover (50%), tall fescue (57%), ryegrass (60%), alfalfa (68%) and Rusi'Flore (80%). Amendment with commercial mycorrhizal inoculum increased significantly the mycorrhizal 230 231 rate in clover (P=0.043) by 26.5% compared to non-inoculated clover, while no improvements of mycorrhizal root colonization were observed with other plant species. The 232 sterilization have a significant impact on the plant colonization by the AMF, the mycorrhizal 233 234 root rate was significantly more important in the plant cultivated on non-sterilized soil than on sterilized one, the mycorrhizal colonization rate was decreased by 23% for Rusti'Flore 235 236 (P=0.005) by 28% for ryegrass (P=0.005), by 51% for tall fescue (P=0.005) and by 54% for alfalfa (*P*=0.013). 237

In sterilized soil, mycorrhizal inoculation provided significant growth effects only on shoot 238 tissues of three tested plants (Table 2): an increase of biomass by 31% for clover (P=0.021) 239 and 41% for alfalfa (P=0.049) and a significant decrease of 25% in shoot dry weight for 240 ryegrass (P=0.048). In non-sterilized soil, mycorrhizal inoculation only increased the shoot 241 242 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 of non-inoculated alfalfa (P=0.000, P<0.0001 respectively) (400% and 390% respectively), 245

246 ryegrass (P=0.006, P<0.0001 respectively) (120% and 130%) and tall fescue (P<0.0001,

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,

and root and shoot dry weights of clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue and miscanthus in the presence or not of mycorrhizal inoculum after 20 weeks of culture in microcosms containing aged polluted sterilized or non-

sterilized soils. *P*-values for Mycorrhizal rate, root and shoot dry weight (AMF inoculation and sterilization)

according to Mann-Whitney test. The bolded values are significant at P < 0.05.

	Soil		Clover	alfalfa	ryegrass	tall fescue	Rusti'Flore	miscanthus
_	Starilizad	Non-inoculated	0	0	0	0	0	0
rhiza (%)	Stermzeu	Inoculated	46±12	32±7	51±1	28±7	66±4	34±12
ycor rate	Non starilized	Non-inoculated	50±2	68 ± 8	60 ± 11	57 ± 7	80 ± 6	42 ± 8
M	INOII-Sterilizeu	Inoculated	68±9	70 ± 9	71 ± 9	57 ± 7	83 ± 3	43 ± 15
ţht	Starilizad	Non-inoculated	33±9	54±16	105±2	131±59	-	1634±113
r weig lant)	Stermzeu	Inoculated	48±7	74±46	55±16	199±143	-	1491±73
t dry mg/p	Non starilized	Non-inoculated	48 ± 24	11 ± 3	46 ± 14	39 ± 8	-	1331 ± 400
Roo (j	Non-sterilized	Inoculated	45 ± 13	23 ± 8	37 ± 9	32 ± 8	-	1664 ± 276
	Sterilized	Non-inoculated	292±45	193±36	157±23	163±14	-	3268±178
t dry ght ilant)		Inoculated	383±39	272±100	118±7	246±125	-	3968±144
Shoo wei mg/f	Non starilized	Non-inoculated	295±35	38 ± 6	72 ± 6	65 ± 11	-	3629 ± 576
v 1 _	Noll-Stermizeu	Inoculated	323 ± 56	102 ± 41	73 ± 18	50 ± 12	-	4087 ± 1249
Mycorrh	izal rate	AMF inoculation	0.043	0.872	0.076	1.000	0.511	0.872
Wiycom		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 dr	v weight	AMF inoculation	0.021	0.049	0.048	0.970	NC	0.427
biloot ui	y weight	Sterilization	0.140	<0.0001	<0.0001	<0.0001	NC	0.734

253

254 Diversity of rhizosphere microbial communities

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

In non-sterilized soil, we obtained 324282 16S rDNA reads for Bacteria that were clustered into 5263 OTUs (after excluding singletons). Number of reads per sample ranged from 5471 to 13774. For fungi, we obtained a total of 1155902 ITS reads that were clustered into 19010 OTUs (after excluding singletons). Number of reads per sample ranged from 11759 to54968.

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

The number of OTUs of bacteria was significantly higher in non-sterilized soil (1186 to 1500 268 OTUs observed) compared to sterilized soil (623 to 824 OTUs) (Table 3A and 3B), regardless 269 of the treatment conditions, (P=0.005 for non-vegetated, P=0.005 for alfalfa, P=0.002 for 270 clover and ryegrass, P=0.002 for Rusti'Flore and P=0.045 for tall fescue). Similarly, the 271 272 OTUs richness (Chao1 estimator) was also significantly higher in the non-sterilized soil (1424 to 1616) compared to sterilized soil (751 to 938) regardless of the treatment conditions (Table 273 274 3A and 3B) (P=0.002 for non-vegetated, P=0.002 for clover, alfalfa, ryegrass and Rusti'Flore and P=0.045 for tall fescue). Shannon index varied among the two types of soils (sterilized 275 and non-sterilized), regardless of the treatment conditions (P=0.002 for non-vegetated, clover, 276 alfalfa, ryegrass, Rusti'Flore, and P=0.045 for tall fescue). However, we observed a 277 significant effect of mycorrhizal inoculation on bacterial richness (Chao1 estimator) in alfalfa 278 279 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 (Shannon index) (Table 4) for other plants. 281

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

296

297

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

301 A)

			Observed OTUs Chao1 richness of		ess estimate	s estimate Shannon divers		
			Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated
		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	$919\pm 69 \qquad \qquad 907\pm 29$		7.4 ± 0.05
	eria	alfalfa	772 ± 21	815±26	854 ± 6	991 ± 32	7.7 ± 0.21	7.5 ± 0.28
	Bact	ryegrass	706 ± 23	741±57	751 ± 50	831 ± 83	7.1 ± 0.15	6.8±0.19
ii		tall fescue	792 ± 155	915±34	938 ± 188	1110 ± 49	7.7 ± 0.71	7.8 ± 0.23
ed sc		Rusti'Flore	775 ± 48	774±53	916 ± 104	881 ± 67	7.9 ± 0.08	7.5 ± 0.01
riliz		non-vegetated	669 ± 374	544 ± 127	9732 ± 4822	14593 ± 9458	2.6 ± 0.17	3.2 ± 1.04
Ste		clover	441 ± 209	588 ± 316	11543 ± 3847	14504 ± 4800	2.6 ± 0.24	3.4 ± 0.23
	.13	alfalfa	273 ± 237	826±252	11059 ± 3830	22689±6247	2.6 ± 0.85	3.7 ± 0.17
	Fun	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 ± 0.1
B)								

302

Observed OTUs Chao1 richness		ess estimate	Shannon diver	sity index				
			Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated
		non-vegetated	1186 ± 156	1143 ± 24	1424 ± 170	1447 ± 61	8.7 ± 0.09	8.8±0.06
sria		clover	1500 ± 128	1488 ± 41	1603 ± 114	1690 ± 15	8.8 ± 0.05	8.8±0.06
	eria	alfalfa	1338 ± 55	1286 ± 81	1608 ± 88	1633 ± 101	8.9 ± 0.07	8.9 ± 0.10
	Bacto	ryegrass	1383 ± 17	1387 ± 109	1616 ± 96	1584 ± 78	8.7 ± 0.14	8.8 ± 0.10
soil		tall fescue	1359 ± 106	1061 ± 253	1601 ± 46	1285 ± 437	8.9 ± 0.09	8.4 ± 0.98
lized		Rusti'Flore	1275 ± 198	1211±135	1573 ± 132	1495 ± 94	9 ± 0.04	8.8 ± 0.30
steri		non-vegetated	715 ± 71	914 ± 94	1376 ± 204	1681 ± 310	6.7 ± 0.15	6.9±0.73
-uoj		clover	969 ± 98	876 ± 69	1346 ± 182	1340±224	6.4 ± 0.29	6.5±0.91
Z	. <u>1</u> 2	alfalfa	863 ± 176	903±44	1399 ± 149	1436±259	4.9 ± 0.54	6.5±0.85
	Fur	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

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

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.

Ob	served OTUs		non-vegetated	clover	ver alfalfa ryegrass tall fescue R		Rusti'Flore	
	Sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.507	0.663	0.121	0.663	0.383	1.000
	Steringed son	Vegetation	NC	0.005	0.005	0.013	0.020	0.005
Bacteria	Non-sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	1.000	1.000	0.663	0.663	0.100	1.000
Dacterra		Vegetation	NC	0.002	0.020	0.008	0.230	0.378
		Sterilization	0.005	0.002	0.005	0.002	0.045	0.002
	Sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.663	0.663	0.100	0.190	0.010	0.383
	Sterinzed son	Vegetation	NC	0.378	0.810	0.810	0.689	0.378
Fungi	Non starilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.100	0.383	1.000	1.000	0.663	0.006
	Non-sternized son	Vegetation	NC	0.128	0.471	0.936	0.378	0.298
		Sterilization	0.128	0.020	0.066	0.230	0.378	0.128
Chao1	richness estimate		non-vegetated	clover	alfalfa	ryegrass	tall fescue	Rusti'Flore
	Starilized soil	Mycorrhizal inoculation	1.000	1.000	0.002	0.383	0.383	0.383
	Sterinzed son	Vegetation	NC	0.002	0.002	0.810	0.066	0.002
Bacteria	Non starilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.663	0.383	1.000	1.000	0.100	0.663
	Non-sternized son	Vegetation	NC	0.013	0.020	0.031	0.230	0.173
	Sterilization		0.002	0.002	0.002	0.002	0.045	0.002
	Starilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.663	0.663	0.100	0.010	0.663	0.383
	Stermzed son	Vegetation	NC	0.810	0.471	0.173	0.575	0.689
Fungi	Non starilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.383	1.000	1.000	0.190	0.010	0.100
0	Non-sternized son	Vegetation	NC	0.230	0.689	0.471	0.378	0.128
	Sterilization		0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
Shanno	on diversity index		non-vegetated	clover	alfalfa	ryegrass	tall fescue	Rusti'Flore
	Starilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.663	0.663	0.383	0.100	0.663	0.100
	Sterilized soli	Vegetation	NC	0.936	0.173	0.131	0.128	0.066
Bacteria	Non-sterilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.383	1.000	1.000	1.000	0.383	0.383
	Tion sternized son	Vegetation	NC	0.936	0.173	0.936	0.128	0.093
		Sterilization	0.002	0.002	0.002	0.002	0.045	0.002
	Starilized soil	Mycorrhizal inoculation	0.383	0.019	0.100	0.017	1.000	0.100
	Stermzed son	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
Fungi	Non-Sternized Soll	Vegetation	NC	0.378	0.093	0.065	0.020	0.008
		Sterilization	0.002	0.066	0.002	0.066	0.066	0.045

317

Similarly to the bacterial diversity, the number of fungal OTUs was higher in non-sterilized 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 soil (9286 to 12635) compared to non-sterilized soil (1207 to 1495) regardless of the 322 treatment conditions, for non-vegetated, clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue and Rusti'Flore 323 (P=0.002). Unlike the fungal richness, fungal diversity was significantly higher in non-324 325 sterilized soil compared to sterilized soil especially in non-vegetated soil (P=0.002), alfalfa (P=0.002) and Rusti'Flore (P=0.045) (Table 4). In sterilized soil, the number of fungal OTUs, 326 fungal richness (Chao1 estimator) and diversity (Shannon diversity) weren't significantly 327 influenced by plants cover after 20 weeks of culture in our conditions (Table 5). The 328 329 inoculation of commercial AMF in planted soils led to a significant increase in the number of fungal OTUs with the presence of tall fescue (P=0.010) by 2.8-fold. In parallel to high level 330 of fungal OTUs number, fungal richness (Chao1 estimator) was significantly increased by 331 mycorrhizal inoculation in ryegrass (P=0.010) by 3.5-fold and diversity (Shannon index) 332 appeared to be positively affected by mycorrhizal inoculation only with the presence of clover 333 334 (P=0.019 by 1.3-fold) and ryegrass (P=0.017 by 1.8-fold, Table 4). In non-sterilized soil, fungal OTUs and richness (Chao1 estimator) were not affected by plantation. However, 335 fungal diversity (Shannon) was decreased by vegetation, by 27%, in non-inoculated 336 Rusti'Flore and by 33% in inoculated tall fescue. The inoculation of commercial AMF on 337 Rusti'Flore led to a significant decrease of fungal OTUs by 45% compared to non inoculated 338 Rusti'Flore (P=0.006), and a significant increase of fungal richness (Chao1 estimator) by 339 23% in the presence of tall fescue (P=0.010). Similarly to the bacterial and fungal 340 341 communities, the number of archaeal OTUs was higher in non-sterilized soil (26 to 31 OTUs) compared to the sterilized soil (9 to 13 OTUs), regardless of the treatments (Supplementary 342 Table 1), (P=0.002 for non-vegetated, P=0.002 for alfalfa, P=0.002 for clover and P=0.002343 344 for ryegrass, P=0.045 for tall fescue and P=0.001 for Rusti'Flore). The Chao1 estimator of archaeal OTUs richness and the Shannon index of archaeal OTUs diversity provided highly 345 346 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) regardless of the treatment conditions, non-vegetated clover, alfalfa, ryegrass, tall fescue and 348 Rusti'Flore (P=0.002, 0.001, 0.002, 0.002, 0.002 and 0.001) (Supplementary Tables 1 and 2). 349 350 Archaeal diversity (Shannon index) was also significantly higher in non-sterilized soil (1.5 to 2.9) compared to sterilized soil (0.7 to 1.4) especially in clover (P=0.030), ryegrass (P=0.002) 351 352 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 diversity (Shannon index) weren't significantly influenced by plantation and plant species, nor 354 by mycorrhizal inoculation after 20 weeks of culture (Supplementary Tables 1 and 2). 355

Rhizosphere microbial community composition in soils 356

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





365

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.

Moreover, Mann-Whitney test showed the impact of "sterilization treatment" on these four orders, with the increase of relative abundance of Bacillales (P<0.0001), Burkholderiales (P=0.001) and Sphingomonadales (P<0.0001) and the decrease of Rhizobiales (P<0.0001) (Table 5). In sterilized soil (Figure 1A), no effect of vegetation on the relative abundances of the different bacterial orders were observed. However, plant species had an effect on the relative abundance of dominant orders, such as Sphingomonodales (P=0.001), 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

sterilization according to Mann-Whitney, (plant species) according to Kruskal-Wallis. The bolded values aresignificant at P<0.05.

	Bacteria	Vegetalization	Plant species	AMF inoculation	Sterilization
	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
Sterilized soil	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
	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
Non-starilized soil	Rhizobiales	0.048	0.075	0.937	<0.0001
Non-sternized son	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 modified significantly the relative abundance of Actinomycetales (P < 0.0001), Bacillales 389 (P<0.0001), Burkolderales (P<0.0001), Caulobacterales (P<0.0001), Rhizobiales (P=0.002), 390 Sphingomonadales (P=0.033) and TM7-1 (P<0.0001). In details, mycorrhizal inoculation 391 392 increased significantly Actinomycetales and TM7-1 abundant in all plant species tested. Sphingomonadales in all plant species except in ryegrass, where their abundance decreases. 393 Moreover, Rhizobiales orders increased in the soil cultivated with inoculated ryegrass. The 394 negatively impacts were observed for mycorrhizal inoculation treatment on Bacillales, 395 Burkholderiales, Caulobacterales whatever the plant species tested. Moreover, significant 396 397 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 higher in non-sterilized soil in comparison to sterilized ones. In non-sterilized soil, the 399 400 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 significant decrease of Gaiellales relative abundance (P=0.001), Myxococcales (P=0.010), 403 Rhizobiales (P=0.048), Solirubrobacterales (P=0.001) and 0319-7L14 (P=0.001), and 404 significant increase of Burkholderiales (P<0.0001) and SC-I-84 (P=0.010) in planted soil 405 406 compared to non-vegetated soil (Figure 1B and Table 5). Plant species had also an effect on the relative abundance of dominant orders, such as Actinomycetales (P=0.003), Bacillales 407 (P=0.018), Gaiellales (P=0.008), Myxococcales (P=0.020), Rhodospirillales (P=0.003), 408 Solirubrobacterales (P=0.029), Sphingomonodales (P=0.010), and Syntrophobacterales 409 (P=0.014). Thus, the relative abundance of Actinomycetales were more abundant in ryegrass 410 411 (15%) than clover and tall fescue (12%) and alfalfa (10%). Bacillales were more abundant in clover (6%) than alfalfa, tall fescue and ryegrass (4%) and Rusti'Flore (3%). Gaiellales were 412 413 more abundant in tall fescue (10%) than clover and ryegrass (8%) and Rusti'Flore (6%). Myxococcales were more abundant in tall fescue and Rusti'Flore (6%) than clover and alfalfa 414 415 (4.5%) and ryegrass (3%). Rhodospirales were more abundant in Rusti'Flore (6.5%) than alfalfa, tall fescue and clover (5%) and ryegrass (3.8%). Solirubrobacterales were more 416 417 abundant in tall fescue, clover, alfalfa and ryegrass (4%) than Rusti'Flore (3%). Sphingomonadales were more abundant in alfalfa and ryegrass (8%) than tall fescue and 418 Rusti'Flore (6%) and clover (4%). Finally, Syntrophobacterales were more abundant in 419 420 alfalfa, ryegrass, tall fescue and clover (2.5%) than Rusti'Flore (1%). By contrast to the sterilized soil, introduced mycorrhizal inoculum did not influence the distribution of bacterial 421 422 orders after 20 weeks of culture (Figure 1B and Table 5).

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

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

- 446
- 447
- 448
- 449
- 450
- 451
- 452

453



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

Surprisingly mycorrhizal inoculation in in sterilized and planted soil led to few changes of fungal community. The relative abundances of Orbiliales and Microascales were higher by 2.4-fold, 6-fold in comparison to non-inoculated soil respectively (Figure 2A), when the relative abundance of Pezizales, Sordariales and Hypocreales decreased by 1.6, 5.3 and 6-fold in comparison to non-inoculated soil without plant species, respectively (Figure 2A). Adding Mycorrhizal inoculum to the plants modified significantly the relative abundance of 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 fescue and Rusti'Flore (Figure 2A). In non-sterilized soil (Figure 3B), the fungal community 469 470 was dominated by members of the orders Hypocreales (18%), Sordariales (8%), Pezizales (7%), Agaricales (6%), Microascales (6%), Pleosporales (5.4%) and Icertae sedis (5%). In 471 472 this soil, the vegetation had a significant negative impact on the relative abundance of Pleosporales (P=0.010). However, plant species after 20 weeks of culture, did not modified 473 the fungal community. The addition of the mycorrhizal inoculum modulated significantly 474 (P=0.024) Agaricales in vegetated soil, with a higher abundance in soil cultivated with clover, 475 and lower abundance in soil cultivated with alfalfa, tall fescue and Rusti'Flore. 476

- **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
	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
Sterilized soil	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
	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
Non-sterilized soil	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 soils after 20 weeks of culture are presented in Figure 3. The total PCDD/F residual 483 484 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 sterilized soil, a downward trend in residual PCDD/F concentrations was observed in planted 487 488 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

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

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

504

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

Publication 1



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

541 **DISCUSSION**

In the present study, the structure and diversity of soil microbial communities (Bacteria, Archea and Fungi) which could play an important role in the bioremediation of aged-PCDD/F contaminated soil, were analyzed in sterilized or non-sterilized soil. These soils were amended or not with mycorrhizal inoculum and cultivated with different plant species (clover, alfalfa, ryegrass, fescue, miscanthus and a mixture of plants), whose phytoremediation abilities have been proven in many studies (Joner et Leyval, 2003; Teng et al., 2010; Técher 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 soil, prevented the root colonization of the plants by indigenous AMF and constituted an 550 551 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, a spontaneous colonization by indigenous AMF was observed. Indeed, four different AMF 553 554 species were isolated from the aged-PCDD/F contaminated soil and identified, based on 555 morphological characters, as Funneliformis mosseae, Glomus constrictum, Glomus lamellosum and Glomus geospurum (data not shown). All of the tested plant species were able 556 557 to grow on the PCDD/F-aged contaminated soil and were colonized by indigenous AMF propagules or commercial mycorrhizal inoculum. The root mycorrhizal rates obtained, for 558 559 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 tested. This result confirmed that the indigenous AMF species are often considered more 563 efficient than introduced inoculants in phytoremediation context (Lambert et al., 1980; 564 Henkel et al., 1989; Calvente et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Querejeta et al., 2006) and 565 suggested the worse adaptation of the commercial inoculum to local edaphic conditions such 566 as soil nutrient concentrations and may be the presence of the PCDD/F pollution. Moreover, 567 the addition of commercial inoculum in the non-sterilized soil (which contained indigenous 568 569 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 AMF would be more effective colonizers than introduced inoculants in the polluted soil; or 571 the maximum colonization level may be already reached in regard to the edaphic conditions 572 and cannot be exceeded with further addition of commercial mycorrhizal inoculum. In both 573 574 sterilized and non-sterilized soils, plant species was the important factor that affected mycorrhizal colonization rates, however, introduced commercial inoculant didn't had any 575
576 impact. This result is not surprising and it is in line with several previous studies which reported that the mycorrhizal rate depended strongly on the plant species (Joner et al., 2001; 577 578 Gao et al., 2011). A growth improvement was observed in plants (associated or not with AMF) cultivated in sterilized soil compared to non-sterilized soil. This plant growth 579 580 promotion could be explained by a release of some nutrients can be observed after soil sterilization, for example Mahmood and colleagues (2014) correlated the increase of wheat 581 biomass with the release of soluble carbon and Mn. In our study, higher contents of Mn, Fe 582 and Al were clearly detected in sterilized soil compared to non-sterilized soil. Moreover, the 583 584 positive effect of sterilization on plant growth may be also explained by erradication of soil-585 borne pathogens (Bainard et al., 2013) and/or the increased abundance of soil microbes with high potential of plant growth promotion such as Bacilli which are known as biocontrol 586 587 agents (Shang et al., 2016). Bacilli were highly abundant in our sterilized soil compared to non-sterilized soil. Introduced mycorrhizal inoculant increased aerial biomass in clover and 588 alfalfa cultivated in sterilized soil and in alfalfa grown in non-sterilized soil. This result 589 confirmed the well-known beneficial effect of mycorrhizal inoculation on plant growth (Joner 590 et al., 2001; Köhl et al., 2016). Mycorrhization provides many benefits to the host plant, 591 particularly when the association is established in the early stage of cultivation, by improving 592 593 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 is accepted that soil microbial community structure could be influenced by vegetation, plant 597 mycorrhization and contamination (Bourdel et al., 2016; Rodríguez-Caballero et al. (2017). 598 599 Our results showed that the vegetation with clover, alfalfa and ryegrass increased the number of bacterial OTUs both in sterilized and non-sterilized soils. However, no significant effect 600 601 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; Bourceret et al., 2016). The role of root exudates in regulating soil microbial community 606 607 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, plant species have a significant effect on the relative abundance of dominant bacterial 610

611 (Sphingomonodales, Rhodospirillales and Ellin 329) and fungal orders (Hypocreales, Orbiliales, and Xylariales). In non-sterilized soil, whereas plant species have also a significant 612 effect on the relative abundance of bacterial orders, such as Actinomycetales, Bacillales, 613 614 Gaiellales, Myxococcales, Rhodospirillales, Solirubrobacterales, Sphingomonodales, and 615 Syntrophobacterales, no effect was observed in Fungi. Each plant species is thought to select specific microbial community through exudation of root systems (Berg and Smalla, 2009; 616 Sleytr et al., 2009). The composition of root exudates varies widely among plants which 617 drives relative abundance of microbes in the vicinity of the root (Binet et al., 2001). Plants not 618 only provide nutrients for microorganisms, but some plant species also contain antimicrobial 619 metabolites in their exudates that influence the structure and function of microbial 620 621 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 direct pathway for translocation of photosynthetically derived carbon to microenvironments in 623 624 the soil, thus AMF influenced the development of microbial communities (Solís-Domínguez et la., 2011). Our findings showed that whereas the addition of the mycorrhizal inoculum 625 affected bacterial and fungal community structures both in sterilized and non-sterilized soils, 626 no effect was observed on archaeal community. It's also important to note that the impact of 627 introduced AMF inoculum on microbial communities was dependent of the soil treatment 628 629 (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 Rusti'Flore. By contrast, in non-sterilized soil, mycorrhizal inoculation decreased fungal 632 OTUs in the presence of clover and it increased fungal richness in the presence of tall fescue. 633 634 In sterilized soil, mycorrhizal inoculation positively impacted the development of fungal species belonging to Microascales and Pezizales, and bacterial species belonging to 635 636 Actinomycetales and TM7-1 and Sphingomonadales, Bacillales and Burkholdriales. 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.

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

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

688

689 CONCLUSION

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

720721 **Reference**

- ATSDR, 1998 Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1998.
 Toxicological profile for chlorinated dibenzo-*p*-dioxins (CDDs). Department of Health
 and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, December 1998.
- Arroyo, P., Ansola, G., and Miera, L. E. S. de (2013). Effects of substrate, vegetation and
 flow on arsenic and zinc removal efficiency and microbial diversity in constructed
 wetlands. *Ecol. Eng.* 51, 95–103. doi:10.1016/j.ecoleng.2012.12.013.
- Bainard, L. D., Koch, A. M., Gordon, A. M., and Klironomos, J. N. (2013). Growth response
 of crops to soil microbial communities from conventional monocropping and tree-based
 intercropping systems. *Plant Soil* 363, 345–356. doi:10.1007/s11104-012-1321-5.
- Bakker, M.G., Manter, D.K., Sheflin, A.M., Weir, T.L., Vivanco, J.M. (2012). Harnessing the
 rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. *Plant Soil*360, 1–13.
- Berg, G., and Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure
 and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 1–
 13. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x.
- Binet, P., Portal, J. M., and 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, J.M., Leyval, C. (2001). Application of GC-MS to the study of anthracene
 disappearance in the rhizosphere of ryegrass. *Organic Geochemistry* 32: 217-222.
- 742
- Bonfante, P., Anca, I. (2009). Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: A network of
 interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 63,363-383.
- Bourdel, G., Roy-Bolduc, A., St-Arnaud, M., and Hijri, M. (2016). Concentration of
 petroleum-hydrocarbon contamination shapes fungal endophytic community structure in
 plant roots. *Front. Microbiol.* 7, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2016.00685.
- Broeckling, C. D., Broz, A. K., Bergelson, J., Manter, D. K., and Vivanco, J. M. (2008). Root
 exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 738–744. doi:10.1128/AEM.02188-07.
- Buchan, D., Moeskops, B., Ameloot, N., De Neve, S., and Sleutel, S. (2012). Selective
 sterilisation of undisturbed soil cores by gamma irradiation: Effects on free-living
 nematodes, microbial community and nitrogen dynamics. *Soil Biol. Biochem.* 47, 10–13.

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

- Francioli, D., Schulz, E., Lentendu, G., Wubet, T., Buscot, F., and Reitz, T. (2016). Mineral
 vs. organic amendments: microbial community structure, activity and abundance of
 agriculturally relevant microbes are driven by long-term fertilization strategies. *Front. Microbiol.* 7, 14-46. doi: 10.3389/fmicb.2016.01446
- Gao, Y., Li, Q., Ling, W., and Zhu, X. (2011). Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of
 soils contaminated with phenanthrene and pyrene. *J. Hazard. Mater.* 185, 703–709.
 doi:10.1016/j.jhazmat.2010.09.076.
- Hanano, A., Almousally, I., and Shaban, M. (2014). Phytotoxicity effects and biological
 responses of Arabidopsis thaliana to 2,3,7,8-tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin exposure.
 Chemosphere 104, 76–84. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.10.060.
- Hassan, S. E. D., Bell, T. H., Stefani, F. O. P., Denis, D., Hijri, M., and St-Arnaud, M. (2014).
 Contrasting the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi from hydrocarboncontaminated and uncontaminated soils following willow (Salix spp. L.) planting. *PLoS One* 9, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0102838.
- Henkel, T. W., Smith, W. K. and Christensen, M. (1989). Infectivity and effectivity of
 indigenous vesiculararbuscular mycorrhizal fungi from contiguous soils in southwestern
 Wyoming, USA. *New Phytol.* 112: 205-214.
- Huang, X.F., Chaparro, J.M., Reardon, K.F., Zhang, R., Shen, Q., Vivanco, J.M. (2014)
 Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. Botany
 92: 267–275.
- Huysman, F., Verstraete, W. (1993). Effect of cell surface characteristics on the adhesion of
 bacteria to soil particles. *Biol Fertil Soils*. 16, 21–26.
- Inui, H., Wakai, T., Gion, K., Kim, Y.S., Eun, H. (2008). Differential uptake for dioxin-like
 compounds by zucchini subspecies. *Chemosphere* 73:1602–1607.
- Jenneman, G.E., McInerney, M.J., Knapp, R.M. (1985). Microbial penetration through
 nutrient-saturated Berea sandstone. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:383-391.
- Joner, E. J., and Leyval, C. (2001). Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass
 grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza* 10,
 155–159. doi:10.1007/s005720000071.
- Joner, E.J., Leyval, C. (2003). Rhizosphere Gradients of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (
 PAH) Dissipation in Two Industrial Soils and the Impact of Arbuscular Mycorrhiza.
 Environmental Science & Technology 37: 2371–2375.
- Jones, D. L., Jones, D. L., Hodge, A., and Kuzyakov, Y. (2004). Plant and mycorrhizal
 regulation of rhizodeposition. 459–480.
- Köhl, L., Lukasiewicz C.E., van der Heijden, M.G.A. (2016). Establishment and effectiveness
 of inoculated arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Plant, Cell & 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.
- Lenoir, I., Fontaine, J., and Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal
 responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry* 123, 4–15.
 doi:10.1016/j.phytochem.2016.01.002.
- Lenoir, I., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Frédéric, L., Yolande, D., and Joël, F. (2016).
 Arbuscular mycorrhizal wheat inoculation promotes alkane and polycyclic aromatic
 hydrocarbon biodegradation: Microcosm experiment on aged-contaminated soil. *Environ. Pollut.* 213, 549–560. doi:10.1016/j.envpol.2016.02.056.
- Li, F., Fan, Z., Xiao, O., Oh, K., Ma, X., Hou, W. (2009). "Contamination,chemical speciation and vertical distribution of heavy metals in soils of an old and large industrial zone in Northeast China," *Environ. Geol.* 57, 1815-1823.
- Li, Y., Liang, F., Zhu, Y., and Wang, F. (2013). Phytoremediation of a PCB-contaminated
 soil by alfalfa and tall fescue single and mixed plants cultivation. *J. Soils Sediments* 13,
 925–931. doi:10.1007/s11368-012-0618-6.
- Liu, S. L., Luo, Y. M., Cao, Z. H., Wu, L. H., Ding, K. Q., and Christie, P. (2004).
 Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environ*. *Geochem. Health* 26, 285–293. doi:10.1023/B:EGAH.0000039592.80489.e5.
- Mahmood, T., Mehnaz, S., Fleischmann, F., Ali, R., Hashmi, Z. H., and Iqbal, Z. (2014). Soil
 sterilization effects on root growth and formation of rhizosheaths in wheat seedlings. *Pedobiologia (Jena)*. 57, 123–130. doi:10.1016/j.pedobi.2013.12.005.
- Marco-Urrea, E., Garcia-Romera, I., Aranda, E. (2015). Potential of non-ligninolytic fungi in
 bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. N. *Biotechnol.* 32,
 620–628.
- Marschner, P., Yang, C., Lieberei, R., Crowley, D. E. (2001). Soil and plant specific effects
 on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*.
 33, 1437–1445.
- Marschner, P., and Timonen, S. (2006). Bacterial community composition and activity in
 rhizosphere of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol.* 7. Available
 at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-29420-1_8.
- McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.L., Swan, J.A. (1990). A new
 method which gives an objective measure of colonization of roots by vesiculararbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115, 495–501.
- McNamara, N.P., Black, H.I.J., Beresford, N.A., Parekh, N.R. (2003). Effects of acute gamma
 irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. *Applied Soil Ecology*24, 117–132
- Megharaj, M., Wittich, R.M., Blasco, R., Pieper, D.H., Timmis, K. N. (1997). Superior
 survival and degradation of dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran in soil by soil-adapted
 Sphingomonas sp. strain RW1. *Appl Microbiol Biotechnol.* 48, 109-114.
- 869 Meng, L., Qiao, M., Peter, H.H. (2011). Phytoremediation efficiency of a PAH-contaminated

- industrial soil using ryegrass, white clover, and celery as mono- and mixed cultures. J *Soils Sediments* 11:482–490. DOI 10.1007/s11368-010-0319-y.
- Miclean, M., Levei, E., Gog, A., Ferenczi, L., Majdik, C., Puia, C., Roman, C. (2010).
 Determination of total petroleum hydrocarbons in contaminated soil by FTIR and GCFID methods. *Studia UBB Chemia* 55: 88–91.
- Nam, I., Kim, Y., Schmidt, S., and Chang, Y. (2006). Dioxin by Sphingomonas wittichii
 Strain RW1. *Society* 72, 112–116. doi:10.1128/AEM.72.1.112.
- Niedrée, B., Vereecken, H., and Burauel, P. (2012). Effects of low-level radioactive soil
 contamination and sterilization on the degradation of radiolabeled wheat straw. J. *Environ. Radioact.* 109, 29–35. doi:10.1016/j.jenvrad.2011.12.018.
- Nsanganwimana, F., Pourrut, B., Mench, M., and Douay, F. (2014). Suitability of Miscanthus
 species for managing inorganic and organic contaminated land and restoring ecosystem
 services. A review. J. Environ. Manage. 143, 123–134.
 doi:10.1016/j.jenvman.2014.04.027.
- Nwoko, C.O. (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.
- Oh, K., Cao, T., Li, T., and Cheng, H. (2014). Study on Application of Phytoremediation
 Technology in Management and Remediation of Contaminated Soils. *J. Clean Energy Technol.* 2, 216–220. doi:10.7763/JOCET.2014.V2.126.
- Okparanma, R. (2013). Determination of total petroleum hydrocarbon (TPH) and polycyclic
 aromatic hydrocarbon (PAH) in soils: a review of spectroscopic and non-spectroscopic
 techniques. *Applied Spectroscopy Reviews* 48: 458–486.
- Oliveira, R.S., Vos_atka, M., Dodd, J.C., Castro, P.M.L. (2005). Studies on the diversity of
 arbuscular mycorrhizal fungi and the efficacy of two native isolates in a highly alkaline
 anthropogenic sediment. Mycorrhiza 16, 23-31.
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P., Sarker, M.R. (2011). Germination of spores
 of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved.*Trends in Microbiology*.19, 85-94. DOI:10.1016/j.tim.2010.10.004.
- Querejeta, J.I., Allen, M.F., Caravaca, F., Roldán, A. (2006). Differential modulation of host
 plant δ13C and δ18O by native and nonnative arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid
 environment. *New Phytologist* 169: 379–387.
- Qin, H., Brookes, P. C., and Xu, J. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae alter soil
 bacterial community and enhance polychlorinated biphenyls dissipation. *Front. Microbiol.* 7, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2016.00939.
- Reichenauer, Th.G., Germida, J.J. (2008). Phytoremediation of Organic Contaminants in Soil
 and Groundwater. *ChenSusChem.* 1, 708-717. doi: 10.1002/cssc.200800125
- 807 Rodríguez-Caballero, G., Caravaca, F., Fernández-González, A. J., Alguacil, M. M.,
 808 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.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B.,
 Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B.,
 Thallinger, G.G., Horn, D.J., Van, Weber, C.F., (2009). Introducing mothur: open
 source, platform-independent, community-supported software for describing and
 comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 75377541. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01541-09.
- Shang, Q., Yang, G., Wang, Y., Wu, X., Zhao, X., Hao, H., (2016). Illumina-based analysis of
 the rhizosphere microbial communities associated with healthy and wilted Lanzhou lily
 (Lilium davidii var. unicolor) plants grown in the field. *World J. Microbiol. Biotechnol.*32. doi:10.1007/s11274-016-2051-2.
- Singh, A., Singh, R. S., Upadhyay, S. N., Joshi, C. G., Tripathi, A. K., Dubey, S. K. (2012).
 Community structure of methanogenic archaea and methane production associated with compost-treated tropical rice-field soil. *FEMS microbiology ecology*. 82(1), 118-134.
- Sleytr, K., Tietz, A., Langergrabera, G., Haberla, R., Sessitsch, A. (2009). Diversity of
 abundant bacteria in subsurface vertical flow constructed wetlands. *Ecol. Eng.* 35 (6),
 1021–1025.
- 928 Smith, S.E., Read, D.J., 2008. Mycorrhizal Symbiosis, 3rd edn. Academic, New York.
- Solís-Domínguez, F. A., Valentín-Vargas, A., Chorover, J., and Maier, R. M. (2011). Effect
 of arbuscular mycorrhizal fungi on plant biomass and the rhizosphere microbial
 community structure of mesquite grown in acidic lead/zinc mine tailings. *Sci. Total Environ.* 409, 1009–1016. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.11.020.
- 933 Técher, D., Lava-Gilly, Ph., Henry, S., Bennasroune, 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.
- Teng, Y., Luo, Y., Sun, X., Tu, C., Xu, L., Liu, 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. *Int. J. Phytoremediation* 12, 516–
 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.
- Toljander, J. F., Lindahl, B. D., Paul, L. R., Elfstrand, M., and Finlay, R. D. (2007). Influence
 of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community
 structure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61, 295–304. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00337.x.
- 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

- Van Aken, B., Correa, P.A., and Schnoor, J.L. (2011). Phytoremediation of Polychlorinated
 Biphenyls: New Trends and Promises. *Environ Sci Technol.* 44, 2767–2776.
 doi:10.1021/es902514d.
- Wang, Y., and Oyaizu, H. (2009). Evaluation of the phytoremediation potential of four plant
 species for dibenzofuran-contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 168, 760–764.
 doi:10.1016/j.jhazmat.2009.02.082.
- White, P.A., Claxton, L.D. (2004). Benzo[a]pyrene, polynuclear aromatic compounds, part 1.
 Mutation Research 567, 227-345.
- Zhou, X., Zhou, J., and Xiang, X. (2013). Impact of four plant species and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in soil. Polish J. Environ. Stud. 22, 1239–1245. Available spiked at: http://www.pjoes.com/pdf/22.4/Pol.J.Environ.Stud.Vol.22.No.4.1239-1245.pdf.

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	Observed OTUs		ess estimate	Shannon diversity index		
			Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	
		Non-vegetated	12 ± 1	10 ± 2	12 ± 2	10 ± 2	1.4 ± 0.41	1.0 ± 0.36	
	lio	Clover	11 ± 2	7 ± 2	11 ± 2	6 ± 2	1.2 ± 0.43	0.6 ± 0.44	
	sd sc	Alfalfa	10 ± 1	13 ± 2	9 ± 2	12 ± 2	0.9 ± 0.48	0.9 ± 0.23	
	Sterilize	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	
laea		Rusti'Flore	9 ± 1	9 ± 1	8 ± 1	8 ± 2	0.7 ± 0.47	0.7 ± 0.35	
Arch	1	Non-vegetated	26 ± 2	28 ± 3	25 ± 4	24 ± 1	2 ± 0.33	1.6 ± 0.15	
ł	l soil	Clover	27 ± 2	27 ± 2	27 ± 6	24 ± 3	2.8 ± 0.25	2.3 ± 0.44	
	ized	Alfalfa	28 ± 1	27 ± 2	28 ± 8	24 ± 2	1.5 ± 0.21	1.7 ± 0.10	
	teril	Ryegrass	29 ± 2	28 ± 1	28 ± 5	27 ± 4	2 ± 0.37	2.4 ± 0.40	
	on-s	Tall fescue	26 ± 3	23 ± 9	25 ± 1	22 ± 8	1.5 ± 0.14	1.8 ± 0.67	
	N	Rusti'Flore	31 ± 1	30 ± 2	27 ± 2	28 ± 3	2.9 ± 0.15	2.9 ± 0.09	

985

Table S2: *P* values for community structures of archaea, depends on sterilization according to Mann-Whitney.

987

The bolded	l values are	significant	at P<0.05
The bolace	i varaes are	Significant	ut 1 \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 (%)		YLA1	14 (%)	Methanobacteriales (%)		
			Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	
		Non-vegetated	99.79	99.97	0.01	0.01	0.20	0.02	
	lid	Clover	99.91	100	0.09	0	0	0	
	sd sc	Alfalfa	99.93	99.91	0.07	0.09	0	0	
	iliz6	Ryegrass	99.99	99.99	0.01	0.01	0	0	
	Stei	Tall fescue	99.93	99.99	0.07	0.01	0	0	
aea		Rusti'Flore	99.99	99.99	0.01	0.01	0	0	
Arch	1	Non-vegetated	99.91	99.96	0.09	0.04	0	0	
4	soil	Clover	99.99	99.93	0.01	0.07	0	0	
	lizec	Alfalfa	99.98	99.97	0.018	0.02	0.002	0.01	
	steri	Ryegrass	99.95	98.91	0.026	1.03	0.024	0.06	
	on-s	Tall fescue	99.93	99.89	0.05	0.10	0.02	0.01	
	Z	Rusti'Flore	99.70	99.89	0.30	0.11	0	0	



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

Présentation de la publication 2

D'après les resultats 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 at 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'efficience 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.

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

H Meglouli¹. A Lounès-Hadj Sahraoui¹. M Magnin-Robert¹. B Tisserant¹. M Hijri². J Fontaine¹

- ¹ Unité 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: <u>lounes@univ-littoral.fr</u> (A. Lounès-Hadj Sahraoui)
- 9 Abstract

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

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

33 Introduction

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

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

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

111 Materials and methods

112 Experimental design

113 Soil characteristics

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

123 Mycorrhizal inocula

Two types of AMF inoculum were used in this study. A commercial mix consisting of two commercial inocula: FR140® (*Funneliformis mosseae*, MycAgro Ltd., France) and Solrize® (*Glomus sp.*, Agrauxine Ltd., France) and an indigenous inoculum containing four AMF species (*Glomus constrictum*, *Glomus lamellosum*, *Glomus geosporum* and *F. mosseae*). This indigenous inoculum was obtained in an open pot culture of *Allium porrum* containing the PCDD/F polluted-soil. After six months of plant growth the shoots were eliminated and mycorrhizal roots plus soil containing spores and mycelium were mixed, air-dried for 3 days and used as indigenous inoculum. While 30 g of each inoculum (10 propagules.g⁻¹ of inert granular solid substrate) were added to appropriate pots, non-mycorrhizal treatments received the same amount of autoclaved inoculum (twice at 121°C during 30 minutes). In each pots 5 ml aliquot of a filtrated soil solution ($<40\mu$ m) were added in order to provide a general microbial population free of AMF spores. This filtrate was obtained after imbibition of a nonsterilized soil with demineralized water.

137 Plants

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

145 **Determination of plant biomass**

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

149 **AMF root colonization**

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

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

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

171 Soil enzyme assays

Soil dehydrogenase (HDA) activity. HDA was measured using a modified Tabatabai et al. 172 173 (1982) method. Dehydrogenases convert 2.3.5-triphenyl tetrazolium chloride to formazan. Three replicate samples of Six g of sieved soil samples mixed with 0.06 g CaCO₃, 1 ml of a 174 3% 2.3.5-triphenyltetrazolium chloride and 2.5 ml distilled water. Samples were then 175 incubated for 24 h at 37°C. After incubation; 10 ml of methanol was added to each tube and 176 samples were vortexed. The tubes were then incubated 3 times for 1 h under horizontal 177 agitation (200 rpm) at room temperature. After centrifugation at 2000 rpm for 5 min, the 178 absorbance of the supernatant was read spectrophotometrically at 485 nm. Dehydrogenase 179 activities in the samples were calculated by using calibration graphs. Results are presented as 180 $\mu g/g$ of soil/24h. 181

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

192 Soil DNA extraction and quantification

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

206 PCR and Amplicon sequencing

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

219

220

221

222 **Bioinformatic analysis**

The Illumina datasets were processed as described in Brazilian Microbiome Project 223 (http://www.brmicrobiome.org/16s-profiling-pipeline-illumina) with some modifications. The 224 partial 16S rRNA gene and ITS sequences were processed in Mothur (v.1.34.4) (Schloss et 225 al., 2009) and QIIME (v.1.9.1) (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et 226 227 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) 228 trim off primers with trim.seqs command, and iii) trim.seqs command was used for remove 229 singletons, iv) finally, merged file was separated into individual files for use in QIIME. The 230 next part was performed in QIIME. Sequences were chimera checked against the gold.fa 231 database (http://drive5.com/uchime/gold.fa) and clustered into Operational Taxonomic Units 232 233 (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 234 235 archaea) and the HMM ITS rRNA gene database for fungi. Taxonomy was assigned to the representative sequence of each OTUs using uclust with the Green genes 16S rRNA gene 236 237 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 238 abundances were calculated with Excel on the different datasets to visualize the percentage of 239 the taxonomic affiliations across AMF inoculation and plant species. All Illumina MiSeq 240 databases generated in this study were deposited in the NCBI Sequence Read Archive and are 241 available under the project number (..) 242

243 Statistical analysis

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

251

252

253 **Results**

254 Mycorrhizal rate and plant biomass

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

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

	Mycorrhizal root colonization (%)			Root dry weight (mg/plant)			Shoot dry weight (mg/plant)					
		Indigenous	Com	mercial	Indige	enous	Comn	nercial	Indig	enous	Comm	nercial
	NI	Ι	NI	Ι	NI	I	NI	I	NI	Ι	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	Plant species		1		<0.0001		0.190					
Mycorrhizal inoculation	Mycorrhizal NC		0.044			0.050						
Inoculum origin		0.005			0.190				0.000			

281 Diversity of rhizosphere microbial communities

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

303

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

309

			Observed OTUs		Chao1 richne	ss estimate	Shannon diversity index		
			Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	Non-inoculated	Inoculated	
	IS	non-planted	699 ± 76	1039 ± 41	670 ± 83	1189 ± 115	7.4 ± 0.37	8.3 ± 0.19	
	genor	alfalfa	748 ± 38	1037 ± 39	773 ± 12	1183 ± 24	7.8 ± 0.08	8.2 ± 0.12	
eria	Indi	tall fescue	665 ± 143	1120 ± 106	709 ± 62	1172 ± 69	7.6 ± 0.17	8.3 ± 0.17	
Bact	ial	non-planted	686 ± 35	686 ± 29	732 ± 34	789 ± 60	7.6 ± 0.01	7 ± 0.15	
	nmerc	alfalfa	707 ± 42	893 ± 165	749 ± 69	981 ± 213	7.4 ± 0.09	7.8 ± 0.19	
	Cor	tall fescue	759 ± 33	798 ± 105	755 ± 18	874 ± 149	7.7 ± 0.19	7.3 ± 0.64	
	IS	non-planted	10 ± 1	15 ± 1	9.3 ± 0.6	12.3 ± 1.1	1.6 ± 0.37	2.1 ± 0.08	
	genot	alfalfa	13 ± 1	18 ± 0	9.8 ± 0.3	13.5 ± 3.5	0.8 ± 0.2	1.4 ± 0.57	
iaea	Indi	tall fescue	11 ± 4	16 ± 1	9 ± 3.6	12.6 ± 2.5	1.1 ± 0.23	1.9 ± 0.14	
Arch	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	
	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	
ngi		tall fescue	768 ± 466	689 ± 244	3732 ± 3241	3237 ± 2143	2.2 ± 0.12	3.3 ± 0.85	
Fu	ial	non-planted	590 ± 94	606 ± 155	3781 ± 2866	1108 ± 217	1.9 ± 0.68	1.3 ± 0.05	
	nmerc	alfalfa	763 ± 122	624 ± 186	12146 ± 12206	1251 ± 319	1.9 ± 0.44	2.6 ± 1.17	
	Cor	tall fescue	386 ± 81	511 ± 227	1829 ± 859	2263 ± 2154	1.4 ± 0.66	2 ± 0.94	
		Plantation	0.075		0.26	51	0.356		
D 4		Plant species	1.000)	0.34	1	0.795		
Baci	eria	Mycorrhizal inoculation	0.00	1	<0.00	001	0.030		
		Inoculum origin	0.048	8	0.21	1	0.002		
		Plantation	0.448	3	0.71	0	0.033		
		Plant species	0.503	3	0.86	51	0.436		
Arci	naea	Mycorrhizal inoculation	<0.00	01	0.00	0	0.000		
		Inoculum origin 0.0		4	0.08	88	0.912		
		Plantation	0.72	5	0.43	60	0.111		
Б		Plant species	0.204	4	0.70	07	0.020		
Fun	gı	Mycorrhizal inoculation	0.704	4	0.00	6	0.716		
		Inoculum origin	0.304	4	0.53	57	0.716		

³¹⁰

A taxonomic assignment of OTUs allowed us to identify at least 14 dominant bacterial classes

in the aged PCCD/F contaminated soil (Fig 1A). The bacterial community was dominated by

members of the classes Alphaproteobacteria (25%), Bacilli (11%), Betaproteobacteria (9%),

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



321

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

325

The mycorrhizal inoculation significantly selected Gammaproteobacteria (P=0.001) and led to the decrease of Gemmatimonadetes (P<0.0001), Saprospirae (P<0.0001) and Solibacteres (P=0.035). Furthermore, inoculum origin significantly affected the classes Acidimicrobiia, Bacilli, Betaproteobacteria, Cytophagia, Pedosphaerae and Solibacteres (P=0.041, 0.001, 0.002, <0.0001, 0.013 and 0.000 respectively, Table 3). A highest abundance of Acidimicrobiia, Bacilli and Pedosphaerae were observed when the soil was inoculated with 332 commercial inoculum, whereas Betaproteobacteria, Cytophagia, and Solibacteres were333 increased when the soil was inoculated with indigenous inoculum.

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

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

- 350
- **Table 3**: *P* values for community structures of bacterial and fungal (plants species, plantation, AMF inoculation 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
	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
Bacteria	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
1 01151	Orbiliomycetes	0.154	0.214	0.477	0.085
	Pezizomycetes	0.000	0.931	0.133	0.558

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





361

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

366 Soil microbial activities

- Soil DHA and FDA activities under different treatments are presented in Figure 2. The DHA 367 activity increased significantly when the soil was planted (P<0.0001, Table 4), especially with 368 tall fescue (P=0.001, Table 4) (from 2.1 to 3-fold, Fig. 2A). The association of the plants with 369 370 AMF led to increase the DHA activity in the soil (P=0.000), the impact of the mycorrhizal inoculum was particularly striking with the indigenous inoculum (P=0.001) (2.3-fold). The 371 plantation has a positive impacted on the soil FDA activities (P<0.0001) and varied according 372 to the plant species (P=0.013). The plantation increased FDA activities by 2 and 3-fold in 373 374 indigenous and commercial inoculums condition respectively (Fig. 2B). No significant effects
- of mycorrhizal inoculation and inoculum origin on FDA activities were observed (Table 4).
- 376

378

Table 4: *P* values for TEQ, DHA and FDA according to Mann Whitney test. The bolded values are significant at

	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

381

380 Total PCDD/F concentrations

 $P \le 0.05$. Values are means \pm s.d.

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

390

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

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



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



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

426 **Discussion**

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

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

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

Soil microbial communities play an important role in the biodegradation of polluted soil. In 499 fact, the redundancy analysis indicated that the relative abundance of some microbial classes, 500 501 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 be involved in the PCDD/F dissipation or they are less tolerant to the PCCD/F toxicity. In our 503 504 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 whatever the origin of the inoculum. The majority of studies focused on phytoremediation of 507 508 PCB-soil (Passatore et al., 2014) and very few studies are available on the phytoremediation of aged PCDD/F-contaminated soil. Only Wang and Oyaizu (2009) showed that clover 509 510 reduced significantly dibenzofuran (DBF) in spiking soil after 8 weeks of culture.

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

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

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**

- Adam G, Duncan H (2001) 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 33:943-951
- Ali H, Khan E, Sajad MA (2013). Phytoremediation of heavy metals-Concepts and
 applications. Chemosphere 91:869–881. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.075
- Artursson V, Finlay RD, Jansson JK (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal
 fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. Environ Microbiol
 8:1–10. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x.
- Cabello,MN (1999) Effectiveness of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) isolated
 from hydrocarbon polluted soils. J Basic Microbiol 39:89-95.
- Camprubi A, Calvet C, Estaun V (1995). Growth Enhancement of *Citrus reshni* after
 inoculation with *Glomus-Intraradices* and *Trichoderma aureoviride* and associated
- effects on microbial populations and enzyme activity in potting mixes. Plant Soil 173:
 233–238
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al (2010). QIIME allows analysis of
 highthroughput community sequencing data. Nat Methods 7:335–336.
 doi:10.1038/nmeth.f.303
- Cea M, Jorquera M, Rubilar O, Langer H, Tortella G, Diez MC (2010). Bioremediation of soil
 contaminated with pentachlorophenol by *Anthracophyllum discolor* and its effect on soil
 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 biphenyl571 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.
- Faiad W, Hanano A, Kabakibi MM, Abbady AQ (2016). Immuno-detection of dioxins using a
 recombinant protein of aryl hydrocarbon receptor (AhR) fused with sfGFP. BMC
 Biotechnol 16:1–11. doi:10.1186/s12896-016-0282-9.
- Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. New
 Phytol 176:22–36. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x.
- Futamata H, Uchida T, Yoshida N, Yonemitsu Y, Hiraishi A (2004). Distribution of
 dibenzofuran-degrading bacteria in soils polluted with different levels of polychlorinated
 dioxins. Microbes Environ 19:172–177. doi:10.1264/jsme2.19.172.
- Galazka A, Galazka R (2015). Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils
 artificially polluted using plant-associated-endophytic bacteria and *Dactylis glomerata* as
 the bioremediation plant. Polish J Microbiol 64:241–252.
- Hanano A, Almousally I, Shaban M (2014). Phytotoxicity effects and biological responses of
 Arabidopsis thaliana to 2,3,7,8-tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin exposure.
 Chemosphere 104:76–84. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.10.060.
- Hanano A, Almousally I, Shaban M, Moursel N, Shahadeh A, Alhajji E (2015). 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 15:193.
 doi:10.1186/s12870-015-0583-5.

- Hiraishi A (2003) Biodiversity of Dioxin-Degrading Microorganisms and Potential Utilization
 in Bioremediation. Microbes Environ 18:105–125.
- 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. Environ Microbiol 18:2689–2704. doi:10.1111/14622920.13438.
- Ionescu M, Beranova K, Dudkova V, Kochankova L, Demnerova K, Macek T, Mackova M
 (2009) Isolation and characterization of different plant associated bacteria and their
 potential to degrade polychlorinated biphenyls. Int Biodeterior Biodegrad 63:667–672.
 doi:10.1016/j.ibiod.2009.03.009.
- Karlson U, Dowling DN, O'Gara F, Rivilla R, Bittens M, Francesconi S Pritchard HC,
 Pedersen HC (1998) "Development of Self-Contained Plant/GMM Systems for Soil."
 Bioremediation. Past, Present and Future Risk Assessment When Using GMO's. pp. 23– 31.
- Koske RE, Gemma JN (1989) A modified procedure for staining roots to detect VA
 mycorrhizas. Mycol Res 92:486–488. doi:10.1016/S0953-75628980195-9.
- Kulkarni PS, Crespo JG, Afonso CAM (2008) Dioxins sources and current remediation
 technologies A review. Environ Int 34:139–153. doi:10.1016/j.envint.2007.07.009.
- Lenoir I, Fontaine J, Lounès-Hadj Sahraoui A (2016) Arbuscular mycorrhizal fungal
 responses to abiotic stresses: A review. Phytochemistry 123:4–15.
 doi:10.1016/j.phytochem.2016.01.002.
- Lenoir I, Lounès-Hadj Sahraoui A, Frédéric L, Yolande D, Joël F (2016) Arbuscular
 mycorrhizal wheat inoculation promotes alkane and polycyclic aromatic hydrocarbon
 biodegradation: Microcosm experiment on aged-contaminated soil. Environ Pollut
 213:549–560. doi:10.1016/j.envpol.2016.02.056.
- 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. J Soils Sedi 13:925–931.
 doi:10.1007/s11368-012-0618-6.
- Macek T, Macková M, Káš J (2000) Exploitation of plants for the removal of organics in
 environmental remediation. Biotechnol Adv 18:23–34. doi:10.1016/S07349750(99)00034-8.
- Mansfeld-Giese K, Larsen J, Bodker L (2002) Bacterial populations associated with
 mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. FEMS Microbiol
 Ecol 41:133–140. doi:FEM133 [pii]\n10.1111/j.1574-6941.2002.tb00974.x.
- Margesin R, Zimmerbauer A, Schinner F (2000) Monitoring of bioremediation by soil
 biological activities. Chemosphere 40:339–346. doi:10.1016/S0045-6535(99)00218-0.

- Marschner P, Baumann K (2003) Changes in bacterial community structure induced by
 mycorrhizal colonisation in split-root maize. Plant Soil 251:279–289.
 doi:10.1023/A:1023034825871.
- McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA (1990) A new method which
 gives an objective measure of colonization of roots by vesicular- arbuscular mycorrhizal
 fungi. New Phytol 115:495–501. doi:10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x.
- Meier S, Borie F, Curaqueo G, Bolan N, Cornejo P (2012) Effects of arbuscular mycorrhizal
 inoculation on metallophyte and agricultural plants growing at increasing copper levels.
 Appl Soil Ecol 61:280–287. doi:10.1016/j.apsoil.2011.10.018.
- 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.
- 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.
- OrłowskaE, Godzik B, Turnau K (2012) Effect of different arbuscular mycorrhizal fungal
 isolates on growth and arsenic accumulation in *Plantago lanceolata* L. Environ Pollut
 168:121–130. doi:10.1016/j.envpol.2012.04.026.
- Passatore L, Rossetti S, Juwarkar AA, Massacci A (2014) Phytoremediation and
 bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): State of knowledge and research
 perspectives. J Hazard Mater 278:189–202. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.05.051.
- Petrić I, Bru D, Udiković-Kolić N, Hršak D, Philippot L, Martin-Laurent F (2011). Evidence
 for shifts in the structure and abundance of the microbial community in a long-term
 PCB-contaminated soil under bioremediation. J Hazard Mater 195:254–260.
 doi:10.1016/j.jhazmat.2011.08.036.
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic
 and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans Br
 Mycol Soc 55:158–IN18. doi:10.1016/S0007-15367080110-3.
- Qin H, Brookes PC, Xu J (2016) Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae alter soil bacterial
 community and enhance polychlorinated biphenyls dissipation. Front Microbiol 7:1–10.
 doi:10.3389/fmicb.2016.00939.
- Revathi, K, Haribabu TE, Sudha PN (2011). Phytoremediation of chromium contaminated
 soil using sorghum plant. Int J Environ Sci 2:417–428. doi:10.6088/ijes.00202020005.
- Rodríguez-Caballero G, Caravaca F, Fernández-González AJ, Alguacil MM, FernándezLópezM, Roldán A (2017) Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation mediated changes
 in rhizosphere bacterial community structure while promoting revegetation in a semiarid
 ecosystem. Sci Total Environ 585:838–848. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.128.

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*.Restor Ecol 15:44–52.

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, communitysupported software for describing and comparing microbial communities. Applied and
Environmental Microbiology 75: 7537-7541. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01541-09.

- Smith FA, Smith SE (1996) Mutualism and parasitism: diversity in function and structure in
 the arbuscular (VA) mycorrhizal symbiosis. In: Callow, J.A. (Ed.). Advances in
 Botanical Research, Vol. 22, London, Academic Press, pp. 1-43.
- Solís-Domínguez FA, Valentín-Vargas A, Chorover J, Maier RM (2011) Effect of arbuscular
 mycorrhizal fungi on plant biomass and the rhizosphere microbial community structure
 of mesquite grown in acidic lead/zinc mine tailings. Sci Total Environ 409:1009–1016.
 doi:10.1016/j.scitotenv.2010.11.020.
- Sun M, Fu D, Teng Y, Shen Y, Luo Y, Li Z, Christie P (2011) In situ phytoremediation of
 PAH-contaminated soil by intercropping alfalfa (*Medicago sativa* L.) with tall fescue
 (*Festuca arundinacea* Schreb.) and associated soil microbial activity. J Soils Sedi
 11:980–989. doi:10.1007/s11368-011-0382-z.
- 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.
- Tangahu BV, Sheikh Abdullah SR, Basri H, Idris M, Anuar N, Mukhlisin M (2011) A review
 on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. Int J
 Chem Eng 2011. doi:10.1155/2011/939161.
- 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
 Microbiol Ecol 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 Res Int 2013:1–11. doi:10.1155/2013/863240.
- Tu C, Teng Y, Luo Y, Sun X, Deng S, Li Z, Liu W, Xu Z (2011) PCB removal, soil enzyme activities, and microbial community structures during the phytoremediation by alfalfa in 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.
- Villacieros M, Power B, Sánchez-Contreras M, Lloret J, Oruezabal RI, Martín M, Fernández Piñas F, Bonilla I, Whelan C, Dowling DN, Rivilla R (2003). Colonization behaviour of

- *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*)
 rhizosphere. Plant Soil 251:47–54. doi:10.1023/A:1022943708794.
- Wang Y, Oyaizu H (2009). Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species
 for dibenzofuran-contaminated soil. J Hazard Mater 168:760–764.
 doi:10.1016/j.jhazmat.2009.02.082.
- 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.
- Wilke BM (2005). Determination of chemical and soil properties. In: Margesin R and
 Schinner F, editors, Manual for soil analysis: Monitoring and assessing soil
 bioremediation. Springer, Heidelberg. p. 47–95. doi:10.1007/3-540-28904-6_2
- Zeeb BA, Amphlett JS, Rutter A, Reimer KJ (2006) Potential for phytoremediation of
 polychlorinated biphenyl-(PCB)-contaminated soil. Int J Phytorem 8:199-221.
 doi.org/10.1080/15226510600846749.
- Zhou X, Zhou J, Xiang X (2013) Impact of four plant species and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in spiked soil. Polish
 J Environ Stud 22:1239–1245. Available at: 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	Species-	Cumulative	%	Cumulative	%	Sum	of	all
		values	environment	variation	of	variation of	species-	canoni	cal E	igen
			correlations	species		environment		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		0	0.505	
	4	0.017	0.398	28.5		94.1				
Fungi	1	0.326	0.643	32.6		89.5				
	2	0.018	0.404	34.4		94.5		0.365		
	3	0.017	0464	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 physicochimiques 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 biodisponiblité (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'accroitre 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'accroitre 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 efficience 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

Présentation de la publication 3

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 3,2 10⁸ 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 PCCD/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, parralèllement 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 phytoremdiation and biosurfactant

Hacène Meglouli¹, Joël Fontaine¹, Anthony Verdin¹, Maryline Magnin-Robert¹, Benoît Tisserant¹, Mohamed Hijri², Anissa Lounès-Hadj Sahraoui^{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 (µf). A reduction of 23% of total PCDD/F content was observed in the planted soil combined with four treatments (Fm+RW1+Rh+µf). 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 (Häggblom 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 hydrocarbonpolluted soil (Yu et al., 2011) but no data are available concerning its efficiency in PCDD/Fcontaminated 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 Σ 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 10^8 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.

	Control	Alfalfa (A)	F. mosseae (Fm)	S. wittichii (RW1)	Rhamnolipids (Rh)	Indigenous microflora (µf)
Non-planted	+					
A		+				
A+Fm		+	+			
A+Fm+RW1		+	+	+		
A+Fm+RW1+Rh		+	+	+	+	
$A+Fm+RW1+Rh+\mu f$		+	+	+	+	+

Table 1 Treatments of experimental design.

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 (×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 $\mu g/g$ 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 μ l 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 μ l 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 μ g/ml. Results are presented as μ g/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 humain 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 µl per well. In addition to the various conditions tested, eigth replicates corresponding to the control (unexposed cells) and eigth 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/µL 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 μ l containing 0.2 mM of dNTP, 0.6 μ M of each primer, 1,25 μ l 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*≤0.05). Values are means±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 ($P \le 0.05$). Values are means±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+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*≤0.05). Values are means±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+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*≤0.05). Values are means+s.d. (n=4).

Samples	Dehydrogenase (DHA)	Flurescein diacetate (FDA)		
	(µg/g of soil/24h)	hydrolysase (µg/g of soil)		
Non-planted	65±3a	5±0,1a		
Α	196±28bcd	17±6b		
A+Fm	288±94cd	51±10c		
A+Fm+RW1	186±36bc	55±7c		
A+Fm+RW1+Rh	173±22b	25±4b		
A+Fm+RW1+Rh+µf	281±31d	70±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+µf condition showed significant difference compared to planted soil with alfalfa (A). Total PCDD/F dissipation in A+Fm+RW1+Rh+µf 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+µf 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) 123789 the Hexachlorodibenzofuran (HxCDF) and the 123478 Hexachlorodibenzodioxin (HxCDD) was also identified (data not shown). PCDD/F dissipation in the soil concerned in particular: Octachlorodibenzodioxin 1234678-Heptachlorodibenzodioxin (OCDD), (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+µf (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 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*≤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 $A+Fm+RW1+Rh+\mu f$ 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 μ f compared to soil samples before phytoremediation. *P* value bolded indicate significant differences between A+Fm+RW1+Rh+ μ f condition and control soil before phytoremediation according to the Mann-Whitney test (*P*≤0.05). Values are means+s.d. (n=12).

Cells	Enzymes	A+Fm+RW1+Rh+µf (%)
Lung Cells (Reas?R)	LDH activity vs control	44±24 (<i>P</i> < 0.0001)
Lung Cens (Deas2D)	MDH activity vs control	5±1 (<i>P</i> =0.751)
Liver Cells (HenC?)	LDH activity vs control	5±1 (P= 0.0001)
Liver Cens (http://	MDH activity vs control	18±9 (<i>P</i> < 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+ μ f 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+ μ f 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 μ f (A+Fm+RW1+Rh+ μ f) grown in microcosms for 24 weeks. Values represent mean \pm SD. Different letters indicate significant differences between A+Fm+RW1+Rh+ μ f 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	$481\pm23a$	$488\pm34a$	7.1 ± 0.14a
	$A+Fm+RW1+Rh+\mu f$	$618\pm57b$	$657 \pm 51b$	$7.5\pm0.13b$
Archaea	Non-planted	$9\pm1a$	$8 \pm 1a$	$0.9 \pm 0.42a$
	$A+Fm+RW1+Rh+\mu f$	$7\pm 2a$	$7 \pm 1a$	$1.3 \pm 0.05 a$
Fungi	Non-planted	621 ± 79a	738 ± 209a	1.96±0.8a
	A+Fm+RW1+Rh+µf	$563 \pm 145a$	$1176 \pm 160 b$	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+ μ f condition according to the Tukey (HSD) test (*P*≤0.05).

For fungal community (Fig 6b), all samples showed similar composition at the order level. The nonplanted 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 PCCD/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 PAHpolluted 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+µf). This lower phytotoxicity and cytotoxicity could be explained by the decrease of highly toxic PCCD/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+µf 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 PCCD/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 PCCD/F removal. Indeed, various studies showed that PCCD/F are not transported to plant roots and then transferred into above ground plant tissue because of their hydrophobicity (Zhang et al., 2009). Therefore, we presume that the enhanced PCDD/F removal in A+Fm+RW1+Rh+µf 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+µf 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+µf

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 chysosporium were assessed as potential dioxin degraders (Covino et al., 2016), however PCDD/F degradation by non-ligninolytic fungi such as Cordyces sinensis (Sordariomycetes order) has already been highlighted (Nakamiya et al., 2005). Our results showed that the abundance of Acidimicrobia, Actinobacteria, Chloroflexi, Deltaproterobacteria, Plactomycetia and Solibacteres increased significantly in Fm+RW1+Rh+µf 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+µf) compared to non-planted soil. Therefore, the amplicon sequencing 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. 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 PCCD/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, Swizterland, 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 2chlorodibenzo-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 2,4,8trichlorodibenzofuran 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 plantmicrobe 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 biosurfactantmicroorganism 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 Sahraoui. 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 1,2,3,4,7,8hexachlorodibenzo-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, communitysupported 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 ewaste 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 phytoremédition 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 rhizosphèrique (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 la 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 efficience 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'accroitre 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 PCCD/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 le 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 PCCD/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 PCCD/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'accroitre la biodisponibilité des PCDD/F dans le sol. Par ailleurs, étant donné que l'efficience 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 apparait que l'action combinée des différents amendements permet d'accroitre 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

Synthèse et perspectives

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 PCCD/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 (bactérienes 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 ¹³C (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 ¹⁴C 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 développent 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, Beaudet 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 polluées 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, Beaudet 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, Masfaraud 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 ExudatesRegulateSoilFungalCommunityCompositionandDiversity.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 dioixn-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 biphenylcontaminated 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-organiquespersistants/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.

Dalpé 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 Phytolist 195: 844–856. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04215.x.

De la Providencia IE, Nadimi M, Beaudet 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: Schecter 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]pyreneinduced 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 dibenzofurandegrading bacteria. FEMS Microbiology Lettres 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 Glomalinrelated 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 Dibenzo-p-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 dibenzopdioxins 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 dibenzopara-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 dioxininduced 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 2,4,8trichlorodibenzofuran 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 dibenzopara-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-9O 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, Dushenkv 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 surfactantamended 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 Polychlorobiphényls. 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 PCBcontaminated 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 ofPolychlorinatedDibenzo-p-Dioxinsby Pseudomonasmendocina StrainNSYSU. Environmental Quality 43: 349-357.StrainStrain

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 biphenylcontaminated 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 Microbilogy 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 phenanthrenecontaminated 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 Managment 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 Degrader *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, Mougel 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, Suciu 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 hydrobarbons in the rhizossphere, 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-9O.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 pollutants 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. Solvenf extraction and soil washing treatment of contaminated soils from wood preserving sifes: Bench-scale studies. United States Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, 25 p

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

Sawerysyn JP, Visez N 2003. Les dioxins une famille particulier de pollutants organiques persistnts.

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 Biotechnolica 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, Shinkyo 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 publique 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 921 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. Biogeochemestry 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. Techonol 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 SJJr, 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. Phytormediation assisted by arbuscular mycorrhizal fungi to clean-up dioxins/furan polluted soil of Halluin site. Congrès-Exposition international sur les sols, les sediments 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 sediments 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 mycorhiziens à arbuscules dans la dissipation des sols historiquement pollutes 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 phytoremédition 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 PCCD/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'accroitre l'efficience 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 organochlorined 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 PCCD/F in our experimental conditions, whatever the inoculums origin and the mycorrhizal species which compose it. The degradation of these organochlorined 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.