



Phytoremédiation d'un sol contaminé de la Bekaa (Liban) : Valorisation de la biomasse par production d'huiles essentielles à activités biologiques

Imad El Alam

► To cite this version:

Imad El Alam. Phytoremédiation d'un sol contaminé de la Bekaa (Liban) : Valorisation de la biomasse par production d'huiles essentielles à activités biologiques. Ecologie, Environnement. Université du Littoral Côte d'Opale; École doctorale des Sciences et de Technologie (Beyrouth), 2018. Français. NNT : 2018DUNK0486 . tel-03270794

HAL Id: tel-03270794

<https://theses.hal.science/tel-03270794>

Submitted on 25 Jun 2021

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.



Thèse en cotutelle entre

L'Université Libanaise et l'Université du Littoral Côte d'Opale

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Discipline : Sciences de l'Environnement/Ingénierie des Fonctions Biologiques

**Phytoremédiation d'un sol contaminé de la Bekaa (Liban) :
valorisation de la biomasse par production d'huiles essentielles à
activités biologiques**

Imad El-Alam

Soutenue le 30 Janvier 2018, devant le jury :

Mme. Anissa Lounès-Hadj Sahraoui, Professeur, Université du Littoral Côte d'Opale. Directrice de thèse
Mr. Ramez Chahine, Professeur, Université Libanaise Directeur de thèse
Mr. Anthony Verdin, Ingénieur de recherche, Université du Littoral Côte d'Opale.. Co-encadrant de thèse
Mr. Hassane Makhoul, Professeur, Université Libanaise Co-encadrant de thèse
Mr. Michel-Pierre Faucon, Enseignant chercheur, Institut Polytechnique de La Salle Rapporteur
Mr. Jihad Attieh, Professeur, Université Balamand Rapporteur
Mr. Stéphane Firmin, Enseignant chercheur, Institut Polytechnique de La Salle Examinateur
Mr. Marc El-Beyrouthy, Professeur associé, Université de Saint-Esprit de Kaslik Examinateur
Mr. Joël Fontaine, Maître de conférences, HDR, Université du Littoral Côte d'Opale Membre invité

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord tous les membres du jury qui ont accepté d'examiner cette thèse.

Je remercie vivement mes directeurs de thèse, Pr. Anissa Lounès-Hadj Sahraoui et Pr. Ramez Chahine, *de m'avoir transmis leurs savoirs et de m'avoir guidé tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir poussé aux bouts de mes limites.*

Mes remerciements vont également à Dr. Joël Fontaine, Dr. Anthony Verdin et Pr. Hassane Makhlouf *d'avoir encadré ma thèse. Merci pour votre aide et votre soutien.*

Je remercie *Yolande Dalpé, Professeur à l'Université d'Ottawa pour l'identification* des spores des champignons mycorhiziens à arbuscules.

Merci également à *Sophie Fourmentin, Professeur à l'Université du Littoral Côte d'Opale de m'avoir accueilli au sein de son équipe pour l'évaluation* des activités antioxydantes des huiles essentielles.

Je tiens à remercier également le Dr. Marc El Beyrouthy de *l'Université de Saint-Esprit de Kaslik pour son aide pour la détermination de la composition* des huiles essentielles.

Merci à Natacha, Frédéric et Benoit pour leurs aides techniques et leurs disponibilités.

Je voudrais également remercier l'Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique de m'avoir octroyé la bourse de thèse.

Je remercie ainsi *tous les membres de l'UCEIV Calais*, mes collègues et mes amis qui étaient toujours à mes côtés.

Un grand Merci à mes parents *et mes frères qui m'ont soutenu* tout au long de ce trajet.

Table des matières

Liste des abréviations	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux.....	iii
Liste des photographies	iv
Introduction générale -Objectifs	1
Chapitre 1 : Le fleuve du Litani	7
1. Contexte général	7
2. La pollution du Litani	9
2.1. Les déchets industriels	13
2.2. Les déchets agricoles	14
2.3. Les déchets ménagers et hospitaliers	14
3. Tests de suivi de la toxicité et d'écotoxicité des sols pollués	15
3.1. Tests de suivi de l'écotoxicité du sol	15
3.2. Tests de suivi de la toxicité du sol	17
4. Contexte réglementaire de la gestion des sites et sols pollués.....	18
Chapitre 2 : La phytoremédiation assistée par les champignons mycorhiziens à arbuscules	20
1. Introduction.....	20
2. Cycle de développement des CMA.....	22
2.1. La phase pré-symbiotique	23
2.2. La phase symbiotique	24
3. Intérêt des CMA dans la phytoremédiation	25
3.1. Amélioration de la nutrition minérale et hydrique.....	25
3.2. Protection des plantes contre les stress oxydatifs	26
3.3. Résistance aux stress biotiques	26

3.4.	Amélioration de la stabilisation du sol.....	27
3.5.	Contribution à la dissipation et/ou à l'immobilisation des polluants.....	27
4.	Exemples de phytoremédiation assistée par les CMA.....	28

Chapitre 3 : Filière de valorisation de la biomasse produite sur sols pollués : production d'huiles essentielles32

1.	Introduction.....	32
1.1.	Les processus de prétraitement	32
1.2.	Le dépôt direct de la biomasse végétale contaminée	33
1.3.	La pyrolyse.....	33
1.4.	L'incinération.....	34
1.5.	La gazéification.....	34
1.6.	La méthanisation	35
1.7.	L'extraction liquide.....	35
1.8.	L'agromine.....	35
1.9.	La production des biomatériaux.....	35
1.10.	La production d'HE	35
2.	Huiles essentielles.....	36
2.1.	Méthodes d'extraction	37
2.2.	Principes actifs des HE	40
2.3.	Activités biologiques des HE.....	44
2.4.	Domaines d'application	48
3.	Intérêt de l'encapsulation.....	54

Matériels et Méthodes.....57

1.	Site expérimental	57
2.	Caractérisation physico-chimique du sol	58
2.1.	Caractérisation pédo-agronomique	58
2.2.	Analyse des polluants	60

2.3.	Tests d'écotoxicité	64
2.4.	Test de cytotoxicité	70
2.5.	Analyses statistiques	71
3.	Essai de phytoremédiation assistée par les CMA	71
3.1.	Dispositif expérimental	71
3.2.	Extraction des alcanes	73
3.3.	Extraction des HE	73
3.4.	Analyse de la composition chimiques des HE et des alcanes	74
3.5.	Taux de mycorhization	76
3.6.	Analyses statistiques	76
4.	Activités biologiques des HE	76
4.1.	Matériels biologiques	76
4.2.	Activité antifongique	76
4.3.	Activité antioxydante	78
4.4.	Activité anti-inflammatoire	79
4.5.	Analyses statistiques	79
Présentation de la publication 1		80
Publication 1 : Ecotoxicity evaluation and human risk assessment of an agricultural polluted soil		82
1.	Introduction	83
2.	Materials and Methods	85
2.1.	Experimental site	85
2.2.	Physico-chemical characterization	86
2.3.	Pollutant analysis	87
2.4.	Soil toxicity	88
2.5.	Soil ecotoxicity	88
2.6.	Statistical analysis	90

3. Results.....	90
3.1. Physicochemical characterization.....	90
3.2. Pollutant analysis	91
3.3. Soil Toxicity.....	96
3.4. Soil Ecotoxicity.....	96
4. Discussion.....	101
5. Conclusion	104
Présentation de la publication 2.....	111
Publication 2 : Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoremediation by Origanum syriacum: efficacy on pollutant dissipation and essential oil production	113
1. Introduction.....	114
2. Materials and Methods.....	115
2.1. AMF-assisted phytoremediation.....	115
2.2. Biological activities of Origanum syriacum EO.....	118
2.3. Statistical analyses	121
3. Results.....	122
3.1. AMF-assisted phytoremediation.....	122
3.2. Biological activities of Origanum syriacum EO.....	128
4. Discussion.....	129
5. Conclusion	133
Présentation de la publication 3.....	140
Publication 3 : Screening biological activities of essential oils: antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities	142
1. Introduction.....	143
2. Materials and Methods.....	144
2.1. Essential Oils materials.....	144
2.2. Biological activities of EO extracts	145
3. Statistical analysis.....	147

4. Results.....	147
4.1. Antifungal activity of EO extracts	147
4.2. Antioxidant activity of EO extracts	149
4.3. Anti-inflammatory activity of EO extracts	151
5. Discussion	152
6. Conclusion	154
Synthèse et perspectives	158
Références bibliographiques	164
Liste des valorisations scientifiques.....	186

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$: Oxygène singulet
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AFNOR : Association Française de NORmalisation
APP : Appareil de Pré-Pénétration
ARN : Acide RiboNucléique
ATP : Adénosine TriPhosphate
CO : Monoxyde de carbone
CO₂ : Dioxyde de carbone
CMA : Champignons Mycorhiziens à Arbuscules
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
ETM : Eléments Traces Métalliques
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HE : Huile Essentielle
HO• : Radical hydroxyle
HO₂ : Radical hydroperoxyde
IL- β : Interleukine-1 β
ISO : International Organization for Standardization
LDH : Extracellular Lactate DeHydrogenase
MDH : Mitochondrial DeHydrogenase
O^{2•-} : Anion radicalaire superoxide
PPAM : Plantes à Parfums Aromatiques et Médicinales
RNS : Reactive Nitrogen Species
SOD : SuperOxyde Dismutase
SSP : Sites et Sols Pollués
US EPA : Environmental Protection Agency

Liste des figures

Figure 1 : Les voies d'exposition de l'Homme à la contamination des sols.....	2
Figure 2 : Trajet suivi par le fleuve du Litani (El-Fadel et al., 2003).....	8
Figure 3 : Les principaux affluents du bassin supérieur du Litani (El-Fadel et al., 2003)	9
Figure 4 : Schéma récapitulatif des différents processus de phytoremédiation (Favas et al., 2014)	21
Figure 5 : Cycle de développement des Champignons Mycorhiziens à Arbuscules (Requena et al., 2007)	23
Figure 6 : Schéma explicatif de l'hydrodistillation (Tongnuanchan et Benjakul, 2014).....	37
Figure 7 : Schéma explicatif de la distillation à la vapeur (Tongnuanchan et Benjakul, 2014).....	38
Figure 8 : Structures chimiques de certains composés actifs des HE (Bakkali et al., 2008)	41
Figure 9 : Schéma représentatif de la formation d'un complexe d'inclusion (cyclodextrines/HE).....	54
Figure 10 : Site expérimental : localisation et délimitation des quadrats, sites d'échantillonnage	57
Figure 11 : Échelle des coefficients d'abondance-dominance de Braun-Blanquet (1951).....	68
Figure 12 : Échelle des coefficients de sociabilité de Braun-Blanquet (1951).....	68
Figure 13 : Illustration des possibilités d'intersections pouvant exister entre un axe et une racine colonisée par un CMA (McGonigle et al., 1990)	70
Figure 14 : Schéma d'un quadrat végétalisé	72

Liste des tableaux

Tableau 1 : Type de déchets générés par les différentes industries de la Bekaa (El-Fadel et al., 2003) (modifié).....	10
Tableau 2 : Exemples de travaux portant sur le taux de pollution du Litani	11
Tableau 3 : Les principales activités industrielles dans la plaine de la Bekaa (Ministry of Industry et al., 2016)	14
Tableau 4 : Exemples de tests de suivi de l'écotoxicité des sols (ISO, www.iso.org)	16
Tableau 5 : Tests in vitro utilisés pour l'évaluation de la toxicité du sol (Knox et al., 1986).18	
Tableau 6 : Exemples de certains travaux portant sur la phytoremédiation assistée par les CMA	29
Tableau 7 : Classification des principes actifs des HE (adapté de Bakkali et al., 2008 ; Tongnuanchan et Benjakul, 2014)	42
Tableau 8 : Exemples de travaux d'utilisation des HE comme biopesticides	50
Tableau 9 : Tableau représentant les ions cibles pour les alcanes	61
Tableau 10 : Tableau représentant les ions cibles pour les HAP	63
Tableau 11 : Tableau représentant les ions cibles pour les acides gras	66

Liste des photographies

Photographie 1 : Photographies montrant les conditions végétalisées (à gauche) et non végétalisées (à droite).....	73
Photographie 2 : Extraction des HE par hydrodistillation à l'aide de l'appareil de Clevenger.....	74
Photographie 3 : Activité antifongique par contact direct	77
Photographie 4 : Activité antifongique par volatilité.....	78

Introduction générale - Objectifs

Introduction générale -Objectifs

La pollution des sols menace l'équilibre et la fertilité des sols et par conséquent la durabilité des systèmes agricoles, ce qui en fait de nos jours une problématique particulièrement préoccupante. En héritage de plusieurs décennies d'activités industrielles et d'agriculture intensive, entre 5 et 10 millions de sites pollués sont actuellement répertoriés dans le monde (www.siteremediation.com.au/contaminated-soil/contamination). A elle seule l'Europe représente plus de 2,5 millions de sites contaminés (Panagos et al., 2013) dont 4142 se situent en France (www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr). Au Liban, malgré l'absence à l'échelle nationale d'un inventaire officiel des sites et sols pollués (SSP), il est avéré que de nombreux sites sont contaminés, la principale cause étant l'irrigation des cultures avec des eaux polluées (USAID, 2011a). S'ajoute à cela l'application intensive des intrants chimiques (fertilisants et pesticides) en agriculture, ainsi que les rejets industriels et domestiques, les dépôts des polluants atmosphériques émis par le trafic routier et les industries polluantes, etc. (Bou Kheir et al., 2010).

Parmi les polluants les plus fréquemment détectés figurent les éléments traces métalliques (ETM) et les hydrocarbures (aromatiques polycycliques et aliphatiques) principalement d'origine anthropique. La récalcitrance de ces contaminants provoque leur accumulation, ce qui conduit à une réduction de la fertilité des sols (Bhalerao, 2013), notamment par la diminution de la biomasse microbienne et la modification de la répartition des différentes communautés bactériennes et fongiques du sol (Alrumman et al., 2015 ; Giller et al., 2009, 1998). Par ailleurs, ces contaminants peuvent s'avérer toxiques pour les plantes et causer des chloroses et des nécroses, ou inhiber la croissance racinaire et foliaire (Chaîneau et al., 2003 ; Jaishankar et al., 2014). Au niveau cellulaire, il a été démontré que ces polluants sont des acteurs majeurs dans la survenue du stress oxydant qui résulte d'une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Jaishankar et al., 2014). Les ERO peuvent être à l'origine d'importants dommages cellulaires comme l'altération des lipides membranaires, des protéines et de l'ADN, affectant ainsi le développement végétal (Yadav, 2010).

La pollution des sols constitue donc un vrai problème de santé publique et de sécurité environnementale (Carré et al., 2017). En effet, selon leur nature, ces contaminants peuvent migrer du sol vers les autres compartiments environnementaux et entrer en contact avec l'Homme par différentes voies d'expositions : consommation d'eaux contaminées, de végétaux et d'animaux exposés à la pollution, ainsi que par inhalation des envols de poussières ou encore par contact direct avec le sol pollué (National Health and Medical Research Council, 1999) (Figure 1).

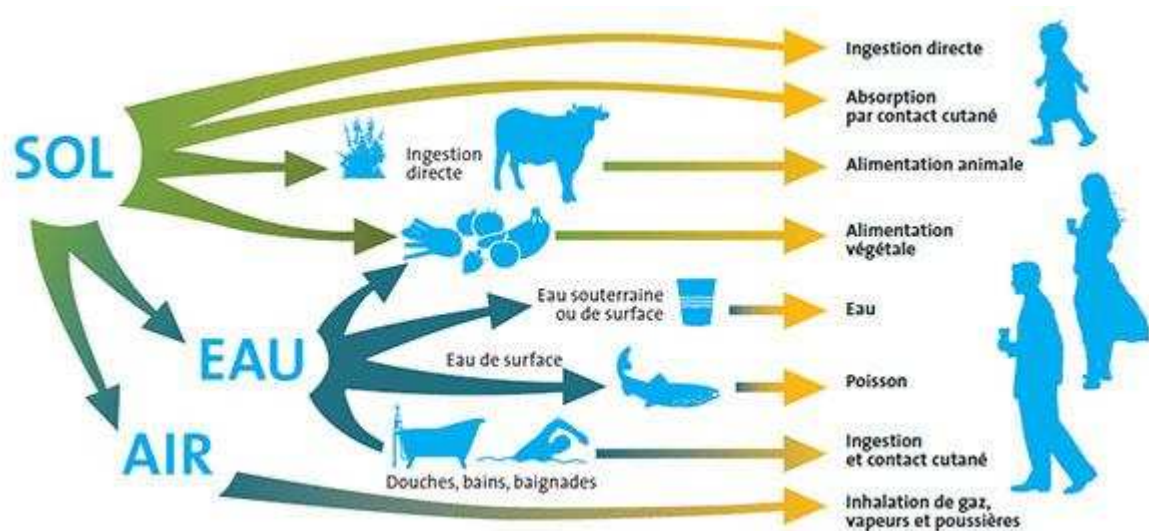


Figure 1 : Les voies d'exposition de l'Homme à la contamination des sols

(Source : Agence Régionale de Santé (ARS), Île-de-France)

De nombreux travaux ont démontré les effets néfastes des polluants sur la santé humaine. Dans leur revue, Govind et Madhuri (2014) rapportent les effets toxiques des ETM sur divers organes vitaux comme le cerveau, le cœur, le foie, les reins et les poumons. De même, les hydrocarbures possèdent des propriétés mutagènes, cancérigènes et reprotoxiques déjà largement démontrées (Mastrangelo et al., 1997 ; Samanta et al., 2002 ; White Jr, 1986).

L'évaluation des risques que présente la contamination des sols vis-à-vis de la santé de l'Homme et de l'environnement débute par les analyses chimiques des polluants qui, bien qu'indispensables, ne nous renseignent pas sur leur toxicité et/ou écotoxicité, d'où l'intérêt de mettre en place des tests de suivi de la toxicité et de l'écotoxicité des sols pollués basés sur des bioindicateurs et/ou des biomarqueurs d'effet. L'US EPA (Environmental Protection Agency) suggère une batterie de tests d'écotoxicité des sols contaminés impliquant des essais de germination des graines, de développement végétal (croissance des racines et des tiges de certaines espèces telles que l'orge, le raygrass et la laitue), de survie, de croissance, de

reproduction et du comportement de certains organismes telluriques (vers de terre, nématodes, microarthropodes, collembolés et isopodes), en plus des tests concernant la viabilité de la microflore tellurique (Greene et al., 1989 ; Stephenson et al., 2002 ; US EPA, 1989 ; www.iso.org).

En outre, l'évaluation des risques de la contamination des sols vis-à-vis de la santé humaine est le plus souvent réalisée par l'intermédiaire de tests *in vitro*. Ces derniers ciblent généralement les effets des polluants sur la viabilité et la morphologie cellulaires (taille et forme de la cellule et du noyau, vacuolisation du cytoplasme, prolifération cellulaire), ainsi que sur l'altération de l'intégrité des membranes (perte des ions et des enzymes cytoplasmiques) (Knox et al. 1986).

Vu les effets néfastes de la pollution des sols sur la santé humaine et l'environnement et compte tenu de l'intérêt porté de nos jours aux questions de santé publique et environnementale par la société, la remédiation des sites et sols pollués est devenue une priorité, aussi bien pour les scientifiques que pour les pouvoirs publics. Cet enjeu est d'autant plus crucial que le nombre de sols agricoles contaminés ne cesse d'augmenter. Ainsi, en France, la loi Grenelle II intègre la gestion et la remédiation des sites pollués dans ses dispositions, en soulignant dans son article 43 l'importance d'utiliser de préférence « les techniques de dépollution par les plantes », c'est-à-dire la phytoremédiation. Cette phytotechnologie est en effet plus conforme aux enjeux du développement durable que les techniques conventionnelles actuellement utilisées (désorption thermique, extraction avec des solvants ou des tensioactifs, oxydation chimique, incinération, vitrification, excavation, lavage et confinement), 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 (au moins 10 fois moins coûteuse que les méthodes physico-chimiques ou d'excavation) (Gerhardt et al., 2009) et applicable aux traitements *in situ* des grandes surfaces de sols contaminés. C'est également une technique facile à mettre en œuvre, basée sur des pratiques agricoles simples et nécessitant peu de technicité spécifique. En outre, contrairement aux méthodes classiques de traitements physico-chimiques, la phytoremédiation est une technique qui génère peu de perturbation du sol et qui présente une bonne intégration paysagère.

Cependant, l'efficacité de cette phytoremédiation dépend, en plus des facteurs climatiques, des propriétés physico-chimiques des polluants, de leur concentration et leur biodisponibilité, de la tolérance des espèces végétales aux polluants mais aussi du potentiel

dégradant du microbiote du sol (Tissut et al., 2006). En effet, les racines stimulent l'activité microbienne et modifient les propriétés physico-chimiques dans la rhizosphère. 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 anthropiques. La majorité des espèces végétales vivent en symbiose avec ces champignons (revue de Bonfante et Perotto, 1995). En échange des substances carbonées fournies par la plante, ces champignons apportent une meilleure nutrition hydrique et minérale à la plante, améliorant ainsi sa croissance. Les mycorhizes peuvent apporter de nombreux bénéfices dans la réhabilitation des sols contaminés : (1) ils augmentent la tolérance des plantes aux polluants grâce à leur aptitude à atténuer le stress oxydant généré par la pollution (Debiane et al., 2009, 2008 ; Miransari, 2011), (2) ils améliorent l'accès des plantes aux éléments minéraux nutritifs (phosphore, azote et oligo-éléments) (Bonfante et Genre, 2008 ; Leung et al., 2013), (3) ils favorisent l'immobilisation des polluants et/ou leur élimination, selon leur nature, en modifiant les conditions physico-chimiques de la rhizosphère et les communautés microbiennes associées à celle-ci (Bhalerao, 2013 ; Hassan et al., 2011 ; Lenoir et al., 2016a). Par ailleurs, un des verrous qui limite également l'usage de la phytoremédiation comme méthode de dépollution des sites contaminés est la rentabilité socio-économique de ce mode de gestion. La valorisation de produits biosourcés, à hautes valeurs ajoutées, issus de la biomasse végétale produite sur des sols contaminés permettrait d'abaisser les coûts globaux de gestion et de requalification des sols pollués et de redonner un intérêt économique à des terres agricoles souvent délaissées tout en répondant aux attentes environnementales, économiques et sociales. Actuellement, très peu de filières de valorisation existent et quelques-unes sont en voie de développement dans les domaines de la bioénergie et de la production des biomatériaux (Gerhardt et al., 2017 ; Ghosh et Singh, 2005). Parmi les filières de valorisation éco-innovantes qui émergent actuellement se positionne la culture d'espèces végétales non-alimentaires telles que les plantes à parfums aromatiques et médicinales (PPAM) productrices d'huiles essentielles (HE) à activités biologiques (biocides, antioxydantes, anti-inflammatoires). En effet, la demande mondiale en HE est en constante augmentation et devrait atteindre 5000 milliards de dollars d'ici la fin de l'année 2050 (Verma et al., 2014). Pour répondre à cette demande, l'expansion de sa production vers les terrains contaminés pourrait être une véritable option d'autant plus que ces composés à haute valeur ajoutée peuvent être utilisés dans diverses industries non-alimentaires (cosmétiques, pharmaceutiques et phytosanitaires).

Ainsi, la présente thèse entre dans ce contexte général de développement d'une nouvelle filière de valorisation non-alimentaire de la biomasse produite sur sols pollués : il s'agit de la production d'HE à activités biologiques.

Ainsi, mes travaux de thèse contribuent à ce projet et visent à la :

- 1- caractérisation physico-chimique et évaluation de l'éco/toxicité d'un sol de la Bekaa irrigué par les eaux du Litani ;
- 2- la phytoremédiation assistée par les CMA en utilisant une plante aromatique productrice d'HE, l'origan : efficacité sur la dissipation des polluants et la production d'HE à activités biologiques ;
- 3- détermination des activités biologiques (antifongiques, antioxydantes et anti-inflammatoires) d'une gamme d'HE pures ou encapsulées.

Ce manuscrit de thèse est structuré en 3 parties principales :

Après une **introduction générale** rappelant le contexte général de ce projet de thèse ainsi que ses principaux objectifs, **la première partie** de ce manuscrit consiste en une revue bibliographique, traitant des sujets suivants :

- la pollution au niveau du fleuve Litani au Liban ;
- la phytoremédiation assistée par les CMA pour dépolluer les sols contaminés ;
- les filières de valorisation de la biomasse produite sur les sols pollués ;
- la production des HE à activités biologiques.

La deuxième partie décrit la démarche et la méthodologie expérimentale utilisées lors de ce travail.

La troisième partie présente les résultats obtenus et leurs discussions organisés en trois publications :

- article 1 : Imad El-Alam, Anthony Verdin, Joël Fontaine, Frédéric Laruelle, Ramez Chahine, Hassane Makhoul, Anissa Lounès-Hadj Sahraoui « Ecotoxicity evaluation and human risk assessment of an agricultural polluted soil » (soumis dans Environmental Monitoring and Assessment) ;
- article 2 : Imad El-Alam, Raviella Zgheib, Marc El Beyrouthy, Anthony Verdin, Joël Fontaine, Ramez Chahine, Hassane Makhoul, Anissa Lounès-Hadj Sahraoui « Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoremediation by Origanum syriacum: efficiency and impact on essential oil composition » (soumis dans Chemosphere) ;

- article 3 : Imad El-Alam, Anthony Verdin, Joël Fontaine, Natacha Bourdon, Sophie Fourmentin, Ramez Chahine, Hassane Makhlouf, Anissa Lounès-Hadj Sahraoui « Screening biological activities of essential oils: antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities » (soumis dans Pharmaceutical Biology).

Enfin, ce manuscrit se termine par une conclusion générale qui met en relation les principaux résultats obtenus dans les différentes expériences et présente quelques **perspectives** envisagées pour la poursuite de ce travail.

Les références bibliographiques citées dans la synthèse bibliographique sont citées à la fin du manuscrit. Les différentes valorisations et communications auxquelles j'ai participé durant mes années de thèse seront présentées en **annexe**.

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1 : Le fleuve du Litani

1. Contexte général

La plaine de la Bekaa (Liban) s'étend sur un plateau de 120 Km de long et 25 Km de large dans la région de Mont-Hermon, à une altitude moyenne de 900 m (Figure 2). Cette plaine se situe entre les deux chaînes montagneuses du Mont-Liban et de l'Anti-Liban où les neiges couvrent les sommets et assurent l'essentiel de l'approvisionnement en eau des cours souterrains et de surface. Deux principaux fleuves traversent la plaine de la Bekaa : le Litani et l'Oronte.

Le fleuve du Litani est l'un des 17 fleuves pérennes au Liban. Avec une longueur de 170 Km, le Litani est le plus long fleuve du pays et occupe 20 % du territoire (2168 Km²).

Ce fleuve prend sa source à Baalbek, traverse la plaine de la Bekaa et se jette dans la Méditerranée, au nord du Tyr, avec un débit moyen de 25 m³/s. Ses eaux sont utilisées pour l'eau potable (station de Taybé), la production d'électricité (centrales hydroélectriques à Markaba, Joun et Bisri) et pour l'irrigation des cultures (Nehme et al., 2014a, 2014b ; USAID, 2012a).

Le barrage de Quaraoun, édifié en 1956, délimite un lac artificiel de 11 Km², « le lac du Quaraoun », qui assure l'irrigation de 310 Km² de terres agricoles dans le sud du Liban et de 80 Km² dans la Bekaa et divise la zone irriguée en deux : « le bassin supérieur » du Baalbek au Quaraoun et « le bassin inférieur » du lac vers Quasmiyé (au nord du Tyr). Le lac a une capacité de stockage pouvant atteindre jusqu'à 220 millions m³ d'eau dont 70 % sont utilisés pour l'irrigation et la production d'électricité, tandis que le reste (60 millions m³ d'eau) est stocké pour servir d'approvisionnement durant la saison sèche (El-Fadel et al., 2003 ; Nehme et al., 2014a).

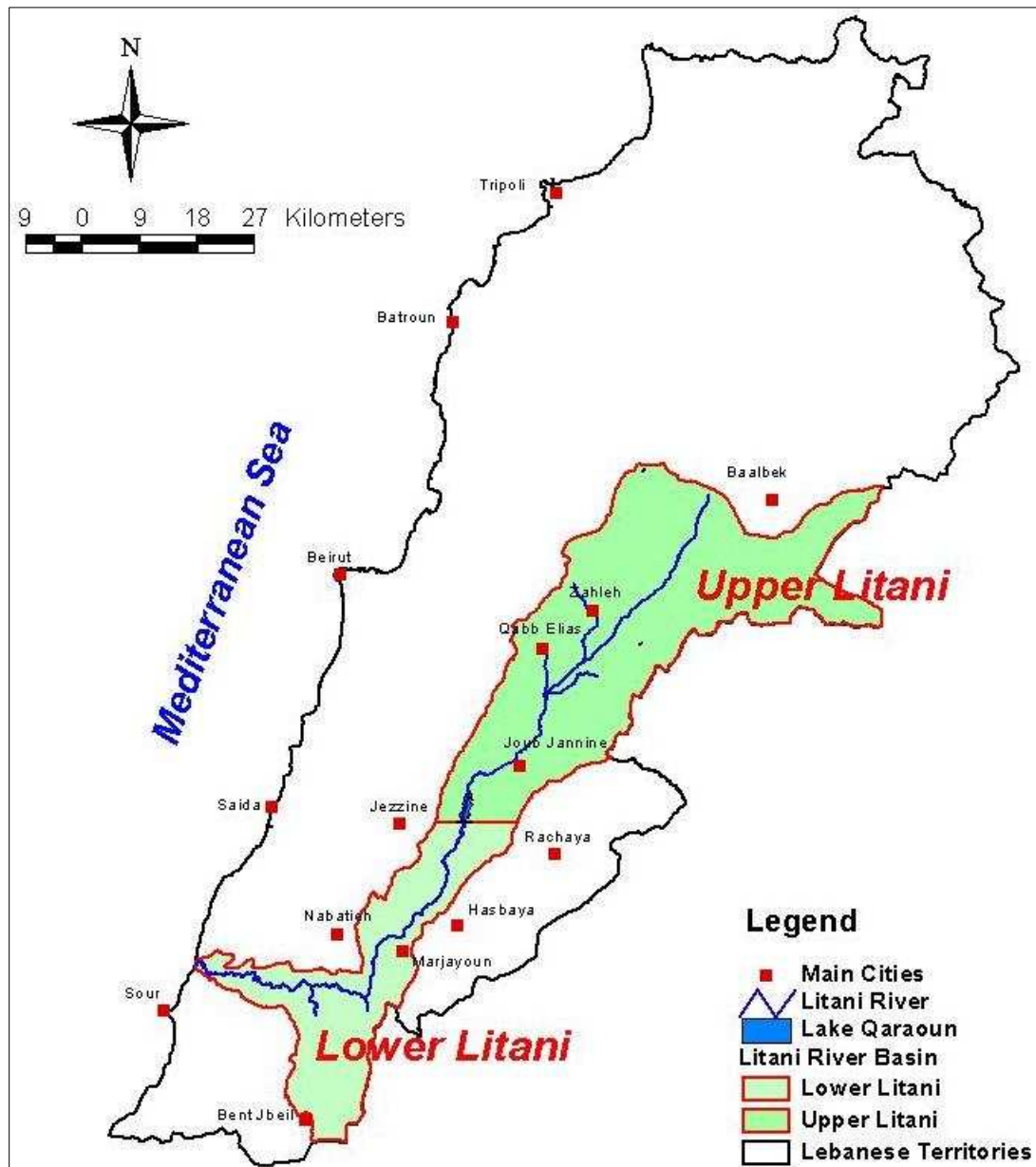


Figure 2 : Trajet suivi par le fleuve du Litani (El-Fadel et al., 2003)

Des affluents provenant des versants Est du Mont-Liban et Ouest de l'Anti-Liban assurent l'approvisionnement du Litani en eau, dont 30 sources, 140 puits opérés par le gouvernement et plus de 1200 puits utilisés par les paysans (Diab et al., 2014). Les deux principaux affluents sont la rivière de Ghozael et la rivière de Berdawni. Ghozael a pour origine Haouch Moussa à Anjar et se relie au Litani en amont de Chebriye. Le Berdawni originaire de Sanine en amont de Qaa Rim, passe par Zahlé et se connecte au Litani à proximité de Bar Elias. La rivière de Berdawni traverse la ville de Zahlé et ses zones industrielles, entrainant avec lui les déchets ménagers et industriels vers le fleuve du Litani (Figure 3).

Le bassin supérieur du Litani reçoit 700 mm de pluie en moyenne annuelle (www.litani.gov.lb). En outre, le trajet suivi par le Litani passe par une variété de climats

allant du subtropical au continental sec (Nehme et al., 2014b) et présente une riche biodiversité en terme de faune et de flore, notamment dans les vallées où le climat est doux (Diab et al., 2014).

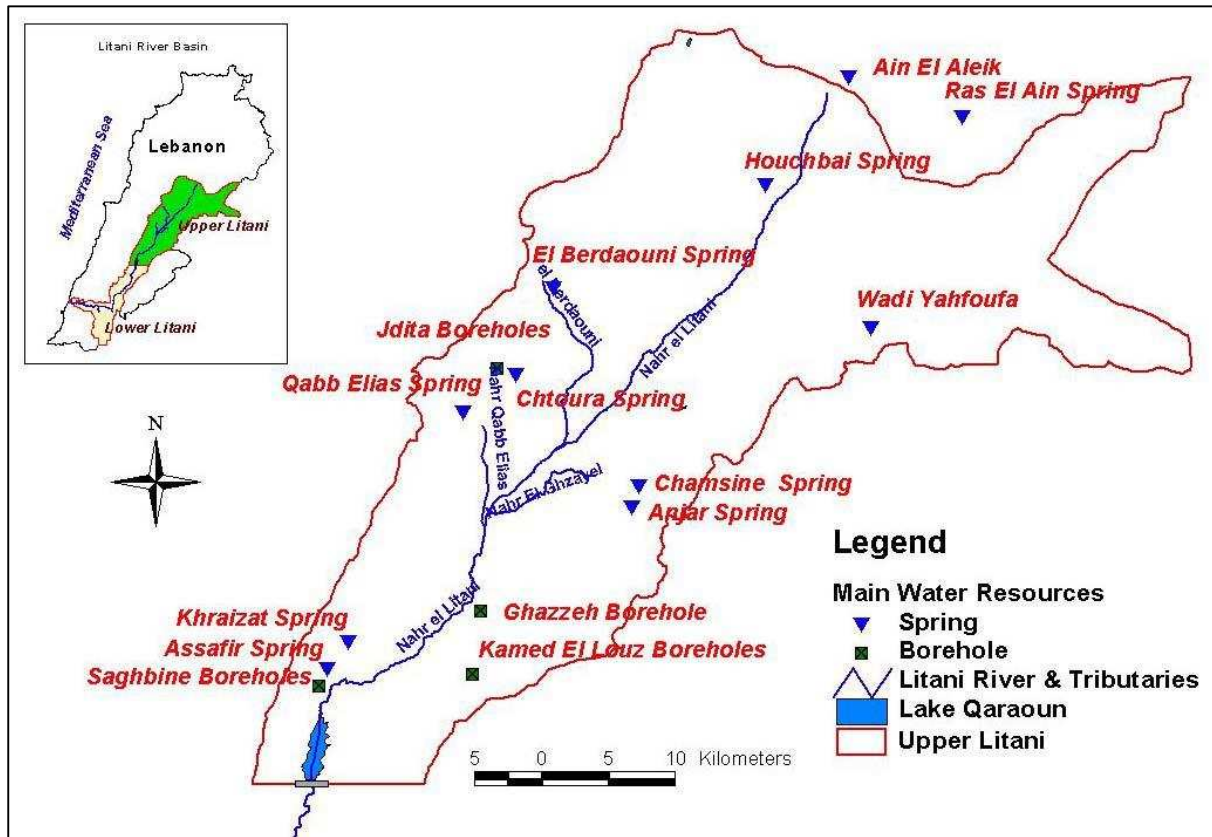


Figure 3 : Les principaux affluents du bassin supérieur du Litani (El-Fadel et al., 2003)

2. La pollution du Litani

L'agriculture intensive au sein de la plaine de la Bekaa, la présence de nombreux déchets domestiques et hospitaliers, ainsi que les rejets industriels (Tableau 1) contaminent le fleuve du Litani. Des études portant sur la qualité de ses eaux ont révélé un niveau de pollution alarmant par des polluants organiques et inorganiques (Tableau 2). Les eaux du Litani sont largement utilisées pour irriguer les cultures, surtout pendant la saison sèche suite à la pénurie des ressources souterraines, provoquant ainsi la contamination des sols et des cultures (Darwish et al., 2011, 2004).

Tableau 1 : Type de déchets générés par les différentes industries de la Bekaa (El-Fadel et al., 2003) (modifié)

Type de l'industrie	Produit	Types de déchets générés
production du sucre	sucre	matières organiques
mines et carrières	marbre et granite	bases, solides en suspension, ETM (Cr, Ni, Cu, Zn), produits chimiques inorganiques
produits alimentaires et boissons	conserves de fruits et légumes	acides, bases, matières organiques, matières en suspension, produits chimiques inorganiques, viandes, huiles, os, plumes, légumes, fruits, graines, boues
produits métalliques	boîtes en acier	acides, bases, huiles, substances inorganiques, produits chimiques toxiques (ETM, cyanure), céramiques, sable, abrasifs, solvants
caoutchoucs et plastiques	vente de pièces de rechange	acides, matières organiques, matières en suspension, produits chimiques inorganiques, produits chimiques toxiques (ETM, pigments), caoutchoucs, plastiques, solvants
pâtes et papiers	papiers hygiéniques et des boîtes en carton	acides, bases, matières organiques, matières en suspension, fibres de papier, produits chimiques inorganiques, papier et pâtes, résidus, boues, produits chimiques, encres, adhésifs, ETM (Hg, Cu, Pb)
cuirs et produits en cuir	vente de chaussures	acides, bases, matières organiques, matières en suspension, produits chimiques inorganiques, produits chimiques toxiques (Cr, sulfure), fibres, boues, huiles, produits de cuir
produits minéraux non métalliques	carrelage en céramique	matière organique, matières en suspension, ETM, verres, ciment, argile, céramiques, amiante, abrasifs
production de plomb et dérivé plombés	feuilles de plomb	plomb, cadmium
réparation de véhicules automobiles		acides, bases, produits chimiques inorganiques, ETM, huiles, verre, fibres, solvants, colorants, fluides, catalyseurs
industrie du bois	meubles	agents de collage, peintures, émulsifiants, vernis

Tableau 2 : Exemples de travaux portant sur le taux de pollution du Litani

	Teneurs des contaminants													Site d'échantillonnage	Période d'échantillonnage	Références
Ions	K ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	CO ₃ ²⁻	K ⁺	Br ⁻	Li ⁺	Cl ⁻	Na ⁺				
	1,3-4 ppm	0,09-2,4 ppm	14-81,2 ppm	0,03-2 ppm	0,06-0,8 ppm	0-19,2 ppm	500-9600 ppm	1,3-4 ppm					eau	<u>LLRB :</u> Qasmieh Abou Abdella Tair Felsay Kaekaeit el jisir Khardali Qelia	mai - juin	(Nehme et al., 2014a)
		1,2-4,3 ppm	3,6-42 ppm			6,5-31 ppm		0,7-6,1 ppm	0,97-6,7 ppm	0,1 ppm	6-50 ppm	5,5-30,5 ppm	eau	<u>ULB et LLRB :</u> Quaraaoun Berdawni Skaf station Deir-zanoun Hawch AlRafika Zahlé Hotel Massabki Bidnayel Khardali Kaakei jesr Tayrfilcay Bourjrahal Kasmeyeh	printemps	(Diab et al., 2014)
ETM	Cd	Cr	Fe	Mn	Zn	Pb	Ca	Mg	Cu	Ni			eau			
	0,00-0,021 ppm	nd	0,016-0,310 ppm	0,01-0,071 ppm	0,008-0,038 ppm	nd	17-39 ppm	10,6-27,8 ppm	0,01-0,04 ppm							
	< ld	0,14-1,25 ppm	158-720,21 ppm	1,59-7,64 ppm	0,5-8,57 ppm	0,02-0,61 ppm	77-1608 ppm	14,05-96,68 ppm	0,05-0,51				Sédiments 0-10 cm			

Chapitre 1 : Le fleuve du Litani

	< ld	0,14-1,98 ppm	140-865,66 ppm	1,59-18,58 ppm	0,5-9,22 ppm	0,02-0,51 ppm	57-1526 ppm	14,05- 87,03 ppm	0,05-0,72 ppm			Sédiments 10-20 cm			
	2-10 ppm	2-40 ppm	980-12000 ppm		40-224 ppm	14-100 ppm				4 ppm		Sédiments (H)	<u>LLRB</u> : Qelia Khardal Kaekaeayat eljisir Tair flsaiy Abou abdellah Qasmieh	hiver	(Nehme et al., 2014b)
	2-36 ppm	2-60 pm	980-20954 ppm		2-80 ppm	0-136 ppm				4-24 ppm		Sédiments (E)		été	
Organismes pathogènes	Staphylococcus aureus			Coliformes totaux		Coliformes fécaux		Salmonella				eau	<u>ULB</u> : El Ouleik Houch el rafika Bednayl Berdawni Darzanoun Masabki Quaraoun	hiver (février) printemps (mai) été (septembre)	(Haydar et al., 2016)
	0-20000 MPN/ 100 mL			0-2600 MPN/ 200 mL		0-1000 MPN/ 100 mL		0 MPN/ 100 mL							
	250-5000 MPN/ 100 mL			0-300000 MPN/ 200 mL		0-300000 MPN/ 100 mL		0-1000 MPN/ 100 mL							
	1000-5000 MPN/ 100 mL			0-300000 MPN/ 200 mL		0-300000 MPN/ 100 mL		0-1000 MPN/ 100 mL							
Pesticides	fenpropathrin (220,1 ng.L ⁻¹), bifenthrin (33,7 ng.L ⁻¹), chlorpropham (34,6 ng.L ⁻¹). lindane (10 ng.L ⁻¹), endosulfanesulfate (10 ng.L ⁻¹), chlorpyrifos (10 ng.L ⁻¹), diazinon (10 ng.L ⁻¹), alachlor (10 ng.L ⁻¹), bromopropylate (10 ng.L ⁻¹), procymidone (10 ng.L ⁻¹), Pendimenthalin (10 ng.L ⁻¹), tetradifon (10 ng.L ⁻¹)											eau	ULB et Lac de Quaraoun	mars - mai	(Kouzayha, 2013)

ULB : Bassin supérieur du Litani (Upper Litani Basin) ; LLRB : bassin inférieur du Litani (Lower Litani River Basin) ; ld : inférieur au limite de détection ; nd : non détecté.

Face à cette problématique, le parlement libanais a voté la loi 63/2016 (parue le 03/11/2016) qui consiste à financer des activités destinées à dépolluer le fleuve Litani (construction de réseaux d'égouts et des stations d'épuration, traitement des déchets industriels, agricoles et domestiques), dans un délai de sept ans. Les différentes activités seront accomplies par les ministères de l'Environnement, de l'Agriculture, de l'Energie et de l'Eau ainsi que l'Office National du Litani. L'ensemble des fonds atteint les 1 100 milliards de livres libanaises sans compter le prêt de la Banque mondiale de 55 millions de dollars pour le nettoyage du lac Quaraoun.

2.1. Les déchets industriels

Le secteur industriel au Liban englobe 4197 industries dont 387 se situent dans la plaine de la Bekaa [323 industries dans le gouvernorat de la Bekaa (cazas de Zahlé, Rachaya et Bekaa Occidentale) et 64 dans le gouvernorat de Baalbek-Hermel] (Ministry of Industry, 2016). Ce secteur rassemble des industries non primaires dont les principaux produits sont de nature agroalimentaire (produits laitiers, viande de volaille, conserves, boissons), ainsi que des produits miniers, des produits chimiques (engrais et plastiques), le cuir et les chaussures, les produits du bois et les meubles, le papier, le textile et les vêtements, les bijoux, les produits métalliques, les équipements de transport, les machines électriques, les véhicules et les matériaux de transport, les raffineries du sucre, le ciment, etc. Le tableau 3 rassemble les différentes activités industrielles de la plaine de la Bekaa.

La plupart des industries déversent leurs déchets solides, liquides et gazeux dans le Litani sans aucun prétraitement. Une partie des déchets solides est déposée avec les déchets municipaux, incinérée, ou recyclée (comme c'est le cas du verre et du plastique). Les déchets gazeux passent dans l'air et dans l'eau du fleuve. Il a déjà été établi que ces rejets industriels peuvent être toxiques et dangereux pour l'environnement et pour la santé publique (USAID, 2014, 2012b, 2011a). Ils comportent, entre autres, des acides, des bases, des ETM, des produits de peinture et des huiles (Tableau 1). Les rejets de la raffinerie de sucre à Majdel Anjar (sur l'affluent Ghozael), ceux de la papeterie de Mimosa ainsi que les rejets d'eaux usées de Qaa El Rim et de Zahlé (tous sur l'affluent Berdawni) sont les principales sources de pollution des eaux du fleuve (El-Fadel et al., 2003).

Tableau 3 : Les principales activités industrielles dans la plaine de la Bekaa (Ministry of Industry et al., 2016)

Produits	Aliments et boissons	Produits non métalliques- Minier, Verre, Porcelaine	Meubles et fourniture	Chimique et plastique	Machines et appareils électriques	Produits métalliques	Papeterie	Produits de bois et menuiseries	Textile et vêtements	Autres	Equipements de transport
Effectif des industries	167	46	40	34	31	30	24	8	4	2	1

2.2. Les déchets agricoles

Les principales cultures de la Bekaa sont les céréales (blé, orge et maïs), les légumes (pomme de terre, tomate, concombre, chou, oignon, ail, etc.), les fruits (agrumes, poire, cerise, pêche, pomme, abricot) et celles dites « cultures industrielles » telles que la betterave à sucre, le tabac et l'olive.

L'utilisation intensive de produits agrochimiques (pesticides et fertilisants) par les agriculteurs est une source importante de contamination du sol ainsi que des eaux de surface et des nappes phréatiques du bassin versant du Litani. Cette contamination se manifeste visuellement par l'eutrophisation des eaux surtout pendant la saison sèche. Les principaux polluants des rejets agricoles sont l'azote, le phosphore et les pesticides dont l'aldrine, le DDT, l'heptachlor, le cadusafos, le diazinon, le chlorpyrifos, le bifenthrin et le procymidone (Youssef et al., 2015). Ces rejets contiennent aussi des microorganismes pathogènes tels que les virus, bactéries coliformes, etc. (USAID, 2012b).

2.3. Les déchets ménagers et hospitaliers

La moitié de la population locale de la Bekaa est raccordée à un réseau d'égouts, 42 % utilisent les fosses septiques tandis que 8 % de la population jette ses déchets domestiques directement dans le fleuve ou bien dans des vallées fermées. En revanche, la rareté des stations d'épuration des eaux usées et de service régulier d'enlèvement des boues (Diab et al., 2014 ; El-Fadel et al., 2003), pose un problème supplémentaire de pollution. Cette contamination est révélée par divers indicateurs tels que la demande biochimique en oxygène, le carbone organique total, les ETM, les substances organiques chlorées, les coliformes fécaux, les salmonelles, etc. (USAID, 2012b).

En outre, les déchets solides municipaux sont uniquement déposés dans des dépotoirs, sans tri préalable ni traitement postérieur, dont ceux à Baalbek, Sifri, Bar Elias, Zahlé et Joub Jannine ainsi que d'autres dépotoirs illégaux qui se situent, dans la majorité des cas, juste à proximité du fleuve. Ces décharges contaminent les cours d'eau avoisinants et les nappes phréatiques (USAID, 2012b).

Par ailleurs, les hôpitaux de la Bekaa déversent leurs déchets médicaux dans le Litani sans traitement, ce qui amplifie le nombre des pathogènes dans le fleuve (El-Fadel et al., 2003).

3. Tests de suivi de la toxicité et d'écotoxicité des sols pollués

Les analyses chimiques des contaminants sont généralement utilisées pour l'évaluation des risques de la pollution des sols. Or, même si elles s'avèrent indispensables, ces analyses seules ne révèlent pas forcément la toxicité vis-à-vis de l'Homme et de son environnement, d'où l'intérêt grandissant des tests d'écotoxicité et de cytotoxicité.

3.1. Tests de suivi de l'écotoxicité du sol

En effet, l'US EPA (Environmental Protection Agency), suggère une batterie de tests d'écotoxicité intégrant les effets écologiques et toxicologiques des polluants chimiques sur les populations, les communautés et les écosystèmes, ainsi que le devenir de ces contaminants dans l'environnement (transport, transformation, dégradation) (Forbes et Forbes, 1994). Citons par exemple, les tests de germination de graines, de développement végétal (croissance des racines et des tiges de certaines espèces végétales de référence telles que l'orge et la laitue) et de survie des vers de terre (comme par exemple *Eisenia foetida*), des nématodes, des microarthropodes, des collemboles et des isopodes (Greene et al., 1989 ; Stephenson et al., 2002 ; US EPA, 1989). Le tableau 4 ci-dessous présente quelques exemples de tests biologiques normalisés pour l'évaluation de l'écotoxicité de sols pollués (ISO, www.iso.org), auxquels s'ajoutent des tests d'évaluation de la qualité des sols. Entre autres, l'ISO 14238 détermine l'influence des produits chimiques sur les processus de minéralisation et de nitrification de l'azote, l'ISO 15685 évalue l'effet de la pollution sur l'inhibition de la nitrification, l'ISO 14239 et l'ISO 15473 déterminent des méthodes de mesure de la minéralisation des contaminants organiques sous conditions aérobies et anaérobies respectivement, l'ISO 17601 sert à estimer l'abondance de séquences de gènes microbiens dans le sol, etc.

Tableau 4 : Exemples de tests de suivi de l'écotoxicité des sols (ISO, www.iso.org)

Niveau trophique	Critères d'effet	Organismes utilisés	Durée d'exposition	Normes
Producteur	germination-croissance	plantes (mono et dicotylédones)	17 jours	ISO 11269-2
		laitue (<i>Lactuca sativa</i>)		ISO 17126
	élongation racinaire	végétaux supérieurs		ISO 11269-1
	toxicité chronique	avoine (<i>Avena sativa</i>) colza (<i>Brassica rapa</i>)	suffisante pour inclure les points de mesure chroniques qui apportent la preuve de la capacité de reproduction des plantes soumises à l'essai	ISO 22030
	génotoxicité	fève (<i>Vicia faba</i>)		ISO 29200
Consommateur	mortalité-biomasse	vers de terre (<i>Eisenia fetida</i>)	14 jours	ISO 11268-1
		Insectes (<i>Oxythyrea funesta</i>)		ISO 20963
	croissance	Escargots (<i>Helix aspersa</i>)	28 jours	ISO 15952
	reproduction	Vers de terre (<i>E. fetida</i>)	28 et 56 jours	ISO 11268-2
		collemboles (<i>Folsomia candida</i>)	28 jours	ISO 11267
		Enchytraeides (<i>E. albidus</i>)	6 semaines	ISO 16387
	comportement	vers de terre (<i>Eisenia fetida</i> et <i>Eisenia andrei</i>)		ISO 17512-1
		collemboles (<i>Folsomia candida</i>)		ISO 17512-2
Décomposeur	activités enzymatiques	Bactéries	6 heures	ISO 11266 ISO 14328
	respiration des microorganismes telluriques		6 à 8 jours	ISO 17155 ISO 16702
	germination des spores de CMA	CMA (<i>Funneliformis mosseae</i>)		ISO/TS 10832
	inhibition de la reproduction	acariens (<i>Hypoaspis aculeifer</i>)		ISO/DIS 21285
	diversité microbienne-analyse des acides gras associés aux phospholipides (PLFA) et des lipides éther phospholipidiques (PLEL)			ISO/TS 29843-1 ISO/TS 29843-2

3.2. Tests de suivi de la toxicité du sol

L'Homme est exposé à la contamination des sols soit directement par inhalation ou par contact direct avec le sol pollué, soit indirectement par la consommation des eaux, des aliments et des animaux exposés eux-mêmes à la pollution. La toxicité des polluants vis-à-vis de l'Homme dépend principalement de leur biodisponibilité (Ruby et al., 1999) et des processus de sorption/désorption dans le sol (Alexander, 1995). Des tests de cytotoxicité sont utilisés pour l'évaluation des risques des contaminants des sols en se basant sur le dosage des biomarqueurs spécifiques tels que le suivi des réponses biochimiques dans l'organisme, par exemple, le dosage des activités enzymatiques dans le sang dont la concentration du Delta-ALAD (delta-aminolevulinic acid dehydratase) pour l'évaluation de la toxicité du plomb et l'activité acétylcholinestérase dans les tissus cérébraux pour l'évaluation de la neurotoxicité ; ainsi que des tests d'évaluation de génotoxicité (anomalies génétiques), des réponses physiologiques et des anomalies histopathologiques dues à la contamination (US EPA, 1989). D'autres tests in vitro sont aussi largement utilisés pour l'évaluation de la cytotoxicité du sol (Tableau 5) (Baderna et al., 2013, 2011 ; Knox et al., 1986 ; Kumbıçak et al., 2014 ; National Health and Medical Research Council, 1999). D'autre part, des normes ISO sont déterminées pour l'évaluation des risques de la toxicité des sols pollués vis-à-vis de l'Homme. Parmi ces normes figure la norme ISO 11504 pour l'évaluation des risques de la contamination des sols par les hydrocarbures, ainsi que l'évaluation de l'exposition humaine par ingestion de sol et de matériaux du sol. La norme ISO/TS 17924 donne des lignes directrices pour l'évaluation de la bioaccessibilité et la biodisponibilité vis-à-vis de l'Homme des ETM présents dans un sol contaminé (ISO, www.iso.org).

Tableau 5 : Tests in vitro utilisés pour l'évaluation de la toxicité du sol (Knox et al., 1986)

Critères d'effet	Tests	Exemples
Morphologie cellulaire	- taille et forme de la cellule - taille du noyau - vacuolisation cytoplasmique	
Prolifération cellulaire	- augmentation du nombre de cellules - augmentation d'ADN, d'ARN et des protéines totales - formation de colonies de cellules	
Viabilité cellulaire	- absorption de colorant vital - baisse du nombre de cellules dans le milieu de culture	
Altération de l'intégrité des membranes cellulaires	- perte d'enzymes	Lactate déshydrogénase (LDH)
	- perte d'ions et de cofacteurs	Ca ²⁺ , K ⁺ , NADPH
	- absorption ou incorporation des précurseurs radioactifs	- synthèse d'Uridine et d'ARN - synthèse du Thymidine et d'ADN - synthèse des acides aminés et des protéines

4. Contexte réglementaire de la gestion des sites et sols pollués

La contamination des sols est une préoccupation mondiale qui incite les législateurs à adopter des lois pour lutter/réduire la pollution et/ou limiter la dispersion des polluants/dépolluer les sols. En effet, les états adoptent souvent des approches similaires dont l'application du principe « pollueur-payeur », la création d'un inventaire public national de sols et sites contaminés et potentiellement contaminés, ainsi que la collecte de fonds pour couvrir les coûts d'assainissement. C'est l'exemple de la loi sur la protection des sols aux Pays-Bas (1996), du décret du Ministère de la communauté flamande relatif à l'assainissement des sols (1995) en Belgique, de la loi fédérale sur la protection des sols (1999) en Allemagne, du Code environnemental (1999) en Suède, etc.

En France, les inventaires des SSP ont été informatisés selon des bases de données dont BASIAS qui vise de recenser les anciens sites industriels et activités de service et BASOL qui permet de répertorier les SSP nécessitant une action administrative. En 2014, la loi ALUR a été adoptée et consiste en la création des Secteurs d'Information sur les Sols ce qui assure un meilleur accès à l'information des terrains sur lesquels l'état a une connaissance de la pollution. Ainsi, la loi Grenelle II (2010) vise à achever l'inventaire des sites pollués

« historiques » afin d'établir les priorités d'action et intègre la gestion et la remédiation des sites pollués dans ses dispositions, en soulignant dans son article 43 l'importance d'utiliser, de préférence, « les techniques de dépollution par les plantes ». De même, le chapitre VI (Livre V) du Cadre de l'environnement (2017) détermine les mesures de gestion des SSP à adopter « en tenant compte de l'efficacité des techniques de réhabilitation dans des conditions économiquement acceptables ainsi que du bilan des coûts, des inconvénients et avantages des mesures envisagées ».

Au Liban, malgré l'absence d'inventaires des sols pollués, la loi 444/2002 relative à la protection de l'environnement, vise à réduire la contamination des sols par la détermination des activités dangereuses du sol et la prévention d'usage de certains engrais et pesticides polluants. Le pollueur doit assumer les coûts des mesures préventives, du contrôle et de la réduction de la pollution, selon le principe du « pollueur-payeur ».

La pollution des sols agricoles du bassin versant du Litani par l'eau du fleuve est donc une problématique très alarmante étant donné que ces contaminants, en plus de perturber la fertilité des sols, peuvent être transférés vers les cultures et donc par la suite vers l'Homme. En plus de maîtriser et de réduire les sources de polluants, la remédiation des sols de la Bekaa est donc un défi national majeur. En dépit de l'efficacité et de la rapidité des méthodes physico-chimiques de dépollution des sols, ces techniques sont très coûteuses et nuisent gravement à la fertilité future des sols. D'où l'intérêt de l'usage de « la phytoremédiation assistée par les champignons mycorhiziens à arbuscules », détaillée dans le chapitre 2 ci-après, comme un outil écologique et innovant de réhabilitation des sols pollués.

Chapitre 2 : La phytoremédiation assistée par les champignons mycorhiziens à arbuscules

1. Introduction

La phytoremédiation est un ensemble de techniques appliquées au traitement des sols pollués utilisant les plantes et les microorganismes associés pour immobiliser (stabilisation, accumulation, séquestration), extraire ou transformer (biodégradation, volatilisation) les polluants (Bago et al., 2000 ; Bert et al., 2012 ; Conesa et al., 2012).

Elle regroupe les techniques suivantes (Figure 4):

- 1- la phytoextraction : prélèvement des polluants par les racines et leur accumulation dans les tiges et les feuilles. Cette méthode utilise les plantes hyperaccumulatrices ou les plantes qui produisent une biomasse importante ;
- 2- la phytodégradation : transformation ou métabolisation des molécules organiques complexes par le métabolisme végétal ;
- 3- la rhizodégradation ou phytostimulation : dégradation des polluants dans le sol par la plante et/ou les microorganismes rhizosphériques associés ;
- 4- la phytostabilisation : réduction de la mobilité des contaminants via l'adsorption sur les racines ou la stabilisation dans la rhizosphère ;
- 5- la phytovolatilisation : transformation de certains polluants tels que les ETM (Zn, Cd, As, Se) et les hydrocarbures, en composés volatils libérés dans l'atmosphère.

Le choix de la technique de phytoremédiation dépend de la nature du contaminant et son devenir dans la plante elle-même ou dans le sol, ainsi que l'étendue de la zone contaminée. En effet, les polluants inorganiques tels que les ETM, les métalloïdes et les molécules radioactives, seront stabilisés par phytostabilisation ou éliminés par phytoextraction.

En revanche, les polluants organiques tels que les hydrocarbures et les pesticides, seront dégradés ou éliminés par phytodégradation, rhizodégradation ou phytovolatilisation (Leung et al., 2013).

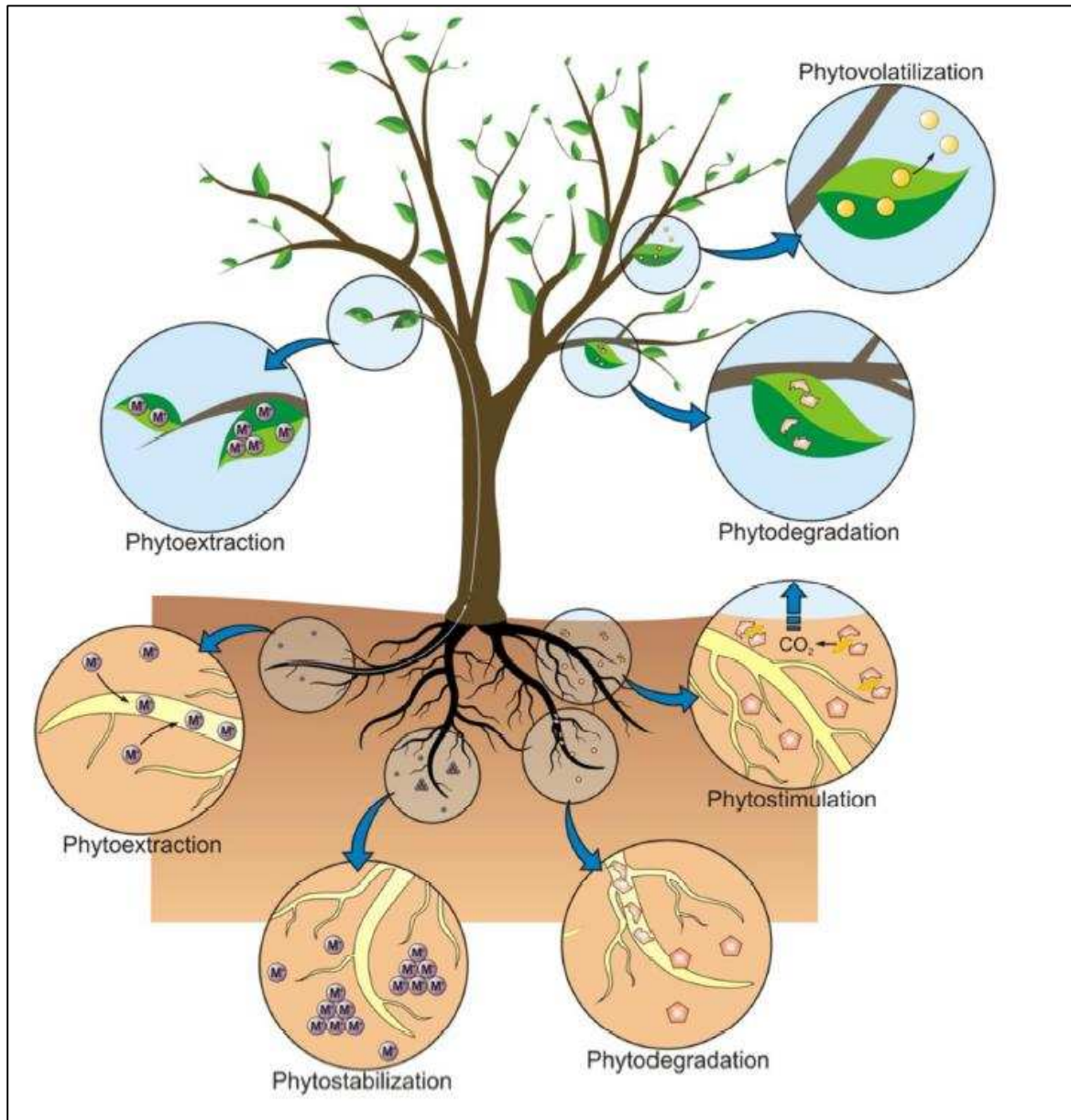


Figure 4 : Schéma récapitulatif des différents processus de phytoremédiation (Favas et al., 2014)

La phytoremédiation est donc une solution prometteuse de décontamination des sols. 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 (Origo et al., 2012). Cependant,

certaines inconvénients se présentent comme la lenteur d'action (des années pour dépolluer en partie un site industriel) et la mise en place de ce système qui demande beaucoup de temps par rapport aux procédés physico-chimiques, même en utilisant des plantes à croissance rapide. De plus, celle-ci présente des limites : la taille des plantes et des racines, qui ne permettent pas de dépolluer les horizons profonds, ou la phytotoxicité de certains polluants qui nuit à la mise en place de ce phytoprocédé (Leung et al., 2013). Pour pallier en partie à ces problèmes, l'une des solutions serait l'ajout d'amendements biologiques à base de CMA : cette méthode est appelée la phytoremédiation assistée par les CMA.

La mycorhization (venant du grec « mycos », signifiant champignon et « rhiza », racine) est définie, depuis la fin des années 1880, comme étant une association symbiotique entre les champignons du sol et les racines des plantes.

Les mycorhizes arbusculaires, constituent la symbiose végétale la plus répandue à l'échelle planétaire. Les CMA sont ubiquistes (80 % des plantes terrestres sont mycorhizées) et sont présents dans les écosystèmes alpins, les zones boréales, les forêts tropicales, les prairies et les sols cultivés (Bonfante et Genre, 2008 ; Dalpé, 2005). Des fossiles de plantes d'Aglaeophyton datant du Dévonien, il y a plus de 400 millions d'années, approuvent la co-évolution des deux règnes plantes-champignons, de sorte que ces deux partenaires de la symbiose sont devenus interdépendants (Harrison, 1999). La mycorhization concerne alors la majorité des plantes terrestres : les angiospermes, les gymnospermes, les ptéridophytes et quelques bryophytes (les anthocérotes et les hépatiques), à l'exception des membres des familles des Brassicaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae (Chenopodiaceae) et Urticaceae (Smith et Read, 2008). L'association symbiotique entre ces champignons et les racines de la majorité des plantes terrestres entraîne alors un échange bidirectionnel de composés carbonés de la plante vers le symbiote fongique et de composés minéraux du champignon vers la plante.

2. Cycle de développement des CMA

Le cycle de développement des champignons arbusculaires comprend cinq stades (Requena et al., 2007) (Figure 5) :

Stade 1 : germination des spores et émergence d'un mycélium primaire (pro-mycélium) ;

Stade 2 : contact racinaire et développement d'un appressorium ;

Stade 3 : pénétration du champignon dans la racine et mise en place de la forme intraracinaire du champignon : vésicules et/ou arbuscules ;

Stade 4 : établissement d'un réseau extraracinaire sur lequel se différencient de nouvelles spores ;

Stade 5 : germination des spores après maturation (stade 1).

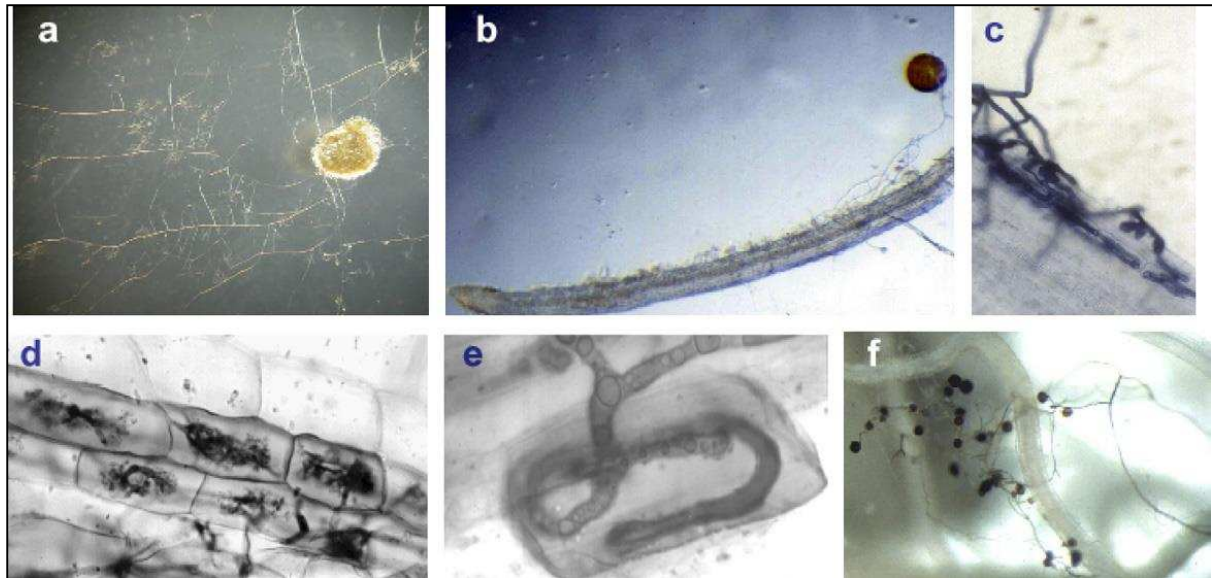


Figure 5 : Cycle de développement des Champignons Mycorhiziens à Arbuscules

(Requena et al., 2007)

(a) spore en germination ; (b) reconnaissance de l'hôte et croissance présymbiotique ; (c) formation de l'appressorium ; (d) formation des arbuscules dans les cellules corticales ; (e) détail de la colonisation de l'hyphe intracellulaire ; (f) mycélium extraracinaire et formation de nouvelles spores.

2.1. La phase pré-symbiotique

2.1.1. Développement du pro-mycélium

Un pro-mycélium ou mycélium primaire, prend naissance à partir de spores plurinucléées quiescentes, utilisant la réserve de carbone sous forme lipidique (Sancholle et al., 2001). C'est le début de la phase asymbiotique ou pré-symbiotique. La formation du pro-mycélium peut avoir lieu même en absence de la plante hôte. Dans ce cas, et après 2 à 4 semaines de la germination, le cytoplasme de l'hyphe se rétracte, des vacuoles et des cloisons apparaissent et les spores entrent en dormance (Smith et Read, 2008). La plupart des noyaux sont bloqués à la phase S ou bien entre les phases G2 et M de mitose en attente des conditions favorables de « re-germination » (Requena et al., 2007).

2.1.2. Dialogue moléculaire

Après la germination des spores, un dialogue moléculaire se déroule entre les CMA et les racines de la plante hôte informant chacun d'eux de la proximité de leur partenaire (Harrison, 1999). Le partenaire végétal émet des exsudats racinaires, les « branching factors », dont le rôle est de stimuler la germination des spores, la mitose, la croissance et la ramification secondaire des hyphes (Bonfante et Genre, 2015, 2010). En parallèle, les CMA émettent des « Myc factor », des lipochitoooligosaccharides (Myc-LCOs) secrétées à l'ordre de picogrammes (Bonfante et Requena, 2011). La réception de ces signaux par la plante engendre une élongation des racines latérales et une accumulation des glucides dans les cellules racinaires, ainsi qu'une activation de différentes voies de signalisation préparant ainsi la colonisation racinaire.

2.1.3. Formation de l'appressorium

Au contact des racines, les hyphes s'arrondissent et s'aplatissent sur les parois des cellules épidermiques : elles se différencient en appressorium (ou hyphopodium), 36 heures après le contact (Bonfante et Genre, 2015). Néanmoins, la simple adhésion de l'hyphopodium avec les racines n'assure pas la pénétration des hyphes dans les cellules épidermiques racinaires (Genre et Bonfante, 2010). Pour cela, une réorganisation des organites des hyphes a lieu : les noyaux migrent près de l'appressorium en laissant derrière eux un agrégat de microtubules, de microfilaments d'actines et de réticulum endoplasmique, ce qui génère l'appareil de pré-pénétration (APP) (Reinhardt, 2007). Ce dernier contrôle la pénétration du CMA via les cellules épidermiques racinaires ou hypodermiques. Les noyaux des cellules épidermiques envahies par l'APP, migrent tout d'abord très près de l'appressorium et en se déplaçant, laissent derrière eux un agrégat de microtubules, de microfilaments d'actines et de réticulum endoplasmique qui croît dans la cellule et permet de contrôler l'entrée du CMA dans la cellule végétale (Song et Kong, 2012).

2.2. La phase symbiotique

La phase symbiotique se traduit par la colonisation des cellules corticales internes de l'hôte par les hyphes fongiques. À l'intérieur du système racinaire, le mycélium se renfle en vésicules. Ce sont des organes de stockage des lipides et des glycolipides.

Les arbuscules, structures fonctionnelles de la symbiose arbusculaire, sont des structures arborescentes de l'hyphe qui se développent entre la paroi cellulaire des plantes et la membrane cytoplasmique. Une membrane péri-arbusculaire, dérivée de la membrane plasmique cellulaire, entoure totalement l'arbuscule et au niveau de laquelle les échanges nutritionnelles se déroulent. En outre, cette membrane permet la séparation du champignon du contenu cytoplasmique végétale (Reinhardt, 2007).

Suite à la colonisation racinaire, des hyphes se développent à l'extérieur des racines. Ces hyphes extraracinaires prélèvent les substances minérales du sol et assurent leur transport jusqu'à l'hôte végétal. Ainsi, elles peuvent coloniser d'autres racines de plante ou génèrent des spores (chlamydospores) qui, après leur maturation, seront à l'origine du promycélium de départ.

3. Intérêt des CMA dans la phytoremédiation

L'ajout d'amendements biologiques à base des CMA en phytoremédiation, permet non seulement une meilleure nutrition minérale de leur hôte végétal, mais contribue aussi à la protection des plantes contre les stress abiotiques et biotiques, ainsi qu'à la stabilité des sols.

3.1. Amélioration de la nutrition minérale et hydrique

La symbiose mycorhizienne se caractérise par un échange nutritif bidirectionnel. Par leurs hyphes, les champignons mycorhiziens peuvent explorer les parties du sol non accessibles par les racines des plantes, assurant ainsi l'approvisionnement en eau et en nutriments minéraux, ce qui améliore la photosynthèse, la transpiration et le développement végétal (Augé, 2001 ; Ruiz-Lozano et al., 1995). En effet, les avantages de la mycorhization se révèlent par l'extension des hyphes au-delà de la partie de la rhizosphère colonisée par les racines des plantes, dans les pores les plus petites du sol parfois non accessibles par les racines ; ce qui augmente la surface d'absorption de l'eau et des nutriments surtout l'azote et le phosphore sous leur forme organique, inaccessibles aux plantes (Bonfante et Genre, 2010). En parallèle, la plante délivre la matière organique nécessaire pour la croissance des champignons, étant hétérotrophes pour le carbone.

L'amélioration de la nutrition minérale et hydrique du symbionte végétal grâce à la mycorhization par les CMA, assure une meilleure croissance végétale ainsi qu'une meilleure tolérance aux stress biotiques et abiotiques (Clark et Zeto, 2000). Cette protection est due

principalement au transport de l'eau à travers les hyphes fongiques vers l'hôte végétal, ainsi qu'au changement des propriétés de rétention de l'eau dans le sol et à la protection des plantes contre les stress oxydatifs générés par les stress environnementaux (Lenoir et al., 2016a).

3.2. Protection des plantes contre les stress oxydatifs

Les CMA présentent un effet protecteur des plantes vis-à-vis du stress oxydatif généré par les contaminants du sol, tels que les ETM ou les hydrocarbures. En effet, ces polluants favorisent la production d'ERO, dont l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($\text{HO}\bullet$) et le radical hydroperoxyde (HO_2). Les ERO sont régulées par le système antioxydant de la plante tels que l'ascorbate, le glutathion et des enzymes tels que la superoxyde dismutase (SOD), la peroxydase ou la catalase (Debiane et al., 2011). Néanmoins, une production excessive et incontrôlée des ERO résulte en un déséquilibre entre leur production et leur détoxification, ce qui engendre des oxydations non spécifiques des protéines et des membranes lipidiques ainsi que des altérations au niveau de l'ADN (Lopareva-Pohu, 2011).

La mycorhization arbusculaire permet d'atténuer le stress oxydatif généré par les contaminants des sols. Par leurs hyphes extraracinaires, les CMA adsorbent les ETM et agissent comme une barrière limitant leur translocation vers la plante (Leung et al., 2013). En outre, les CMA secrètent la glomaline, chélateur des ETM, ce qui empêche également leur transfert vers les tissus végétaux (González-Chávez et al., 2004). Au niveau de la plante, la mycorhization par les CMA induisent les défenses antioxydantes contre le stress généré par les ETM et stimule leur séquestration par les phytochélatines, le glutathion et les métallothionéines (Debiane et al., 2011 ; Firmin et al., 2015 ; Schützendübel et Polle, 2002). La mycorhization permet ainsi de limiter le stress oxydant induit par les HAP et atténue les altérations membranaires et génomiques en réduisant la peroxydation des lipides et la formation d'adduits à l'ADN (8-OHdG) en stimulant les activités enzymatiques antioxydantes telles que la SOD, la peroxydase et la catalase (Debiane et al., 2009, 2008 ; Rabie, 2005).

3.3. Résistance aux stress biotiques

Les CMA protègent les plantes mycorhizées de certains pathogènes et réagissent comme agents de lutte biologique (Dalpé, 2005). En effet, les CMA réduisent l'incidence et/ou la

sévérité des effets délétères causés par des champignons phytopathogènes racinaires tels que *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Phytophthora*, *Pythium* et *Aphanomyces* (St-Arnaud et al., 1995 ; Whipps, 2004) et aériens tels que *Botritis*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Oïdium*, *Phytophthora* et *Magnaporthe* (Comby et al., 2017). Cinq mécanismes d'action agissent de manière indirecte sur les affections parasitaires. Ces mécanismes consistent en l'amélioration de la nutrition végétale, la transformation de la morphologie racinaire, la modification de la microflore et de la composition des sols, ainsi qu'à la stimulation des réactions de défense végétale. D'autres actions ciblent le parasite lui-même qui entre en compétition directe avec le CMA quant à la disponibilité des nutriments et des sites d'infection (Dalpé, 2005).

3.4. Amélioration de la stabilisation du sol

Les hyphes des CMA occupent un volume important dans les sols (entre 81 et 111 m par cm³ de sol (Miller et al., 1995)). Ainsi, elles pénètrent dans les micropores et agissent sur la macroaggrégation des particules du sol et donc sur sa stabilisation (Tisdall, 1991). Cet effet est dû à la production d'une glycoprotéine extracellulaire, la glomaline, (Wright et Upadhyaya, 1998) en grande quantité par le mycélium extraracinaire, à laquelle s'attachent les microagrégats (d'un diamètre inférieur à 250 µm) pour former des macroagrégats stables (supérieur à 250 µm) (Tisdall, 1994). Les CMA confèrent au sol une résilience vis-à-vis l'érosion, la compaction, les inondations, la perte des nutriments et de la matière organique par lixiviation qui entraînent une baisse de la productivité en agriculture (Schreiner et Bethlenfalvay, 1995).

3.5. Contribution à la dissipation et/ou à l'immobilisation des polluants

Plusieurs études ont montré la contribution des CMA dans la dissipation des polluants organiques (Lenoir et al., 2016c). Celle-ci serait le résultat de deux processus : (i) la modification du métabolisme de la plante telle qu'une augmentation de l'activité enzymatique peroxydase au niveau des racines mycorhizées (Criquet et al., 2000), (ii) une modulation et/ou une stimulation des communautés microbiennes à capacité dégradante de la rhizosphère suite à une modification de l'exsudation racinaire (Joner et Leyval, 2003) ou à la présence des hyphes extraracinaires dans le sol (Qin et al., 2016). Il a été montré que 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., 2007), susceptibles de modifier les communautés microbiennes du sol.

De même, les CMA contribuent à la séquestration des polluants inorganiques dont les ETM. Ceci est réalisé grâce à la production de la glomaline par les hyphes extraracinaires fongiques (González-Chávez et al., 2004). Ainsi, ces contaminants peuvent être accumulés au niveau de la paroi fongique et dans les vacuoles, ce qui permet leur immobilisation dans la rhizosphère et limite leur transfert vers la plante hôte (Miransari, 2011).

4. Exemples de phytoremédiation assistée par les CMA

La phytoremédiation assistée par les CMA a été suggérée comme une méthode biologique efficace de remédiation des sols pollués. Plusieurs travaux ont démontré la capacité de la mycorhization à réduire le taux de pollution, à atténuer sa phytotoxicité et à améliorer la croissance végétale (Tableau 6).

Tableau 6 : Exemples de certains travaux portant sur la phytoremédiation assistée par les CMA

	Contaminants	Plante	Inoculum mycorhizien	Culture	Temps d'incubation	Croissance végétative	Dissipation	Transfert et accumulation	Références
Éléments traces métalliques	Zn et Ni (0, 1, 3 et 5 g.Kg ⁻¹ sol)	lentille (Lens culinari) et soja (Glycine max)	Funnelliformis mosseae	En pots (pollution artificielle)	12 semaines	*		*	(Jamal et al. 2002)
	As (93,53 mg. Kg ⁻¹ sol)	Medicago truncatula	R. irregularis	En pots (sol historiquement pollué)	16 semaines	*		*	(Zhang et al. 2015)
	As (0, 50 et 100 mg. Kg ⁻¹ sol)	Pteris vittata Cynodon dactylon	mycorhizes indigènes	En pots (sol historiquement pollué)	8 semaines	*		* (88,1 mg As.Kg ⁻¹ des plantes M contre 60,4 mg As.Kg ⁻¹ des plantes NM)	(Leung et al. 2006)
	Cu, As et Cd (232 mg Cu.Kg ⁻¹ , 54 mg As Kg ⁻¹ , 2,5 mg Cd Kg ⁻¹)	Coreopsis drummondii, Pteris vittata, Lolium perenne Trifolium repens	F. mosseae	En pots (sol historiquement pollué)	3 mois	* (sauf pour L. perenne)		*	(Chen et al. 2007)
Hydrocarbures	Diesel	maïs (Zea mays)	F. constrictum	En pots (pollution artificielle)	12 semaines	*			(Tang et al., 2009)
	« Crude oil »	petit pois (Phalsealus vulgaris)	F. mosseae	En pots (pollution artificielle)	10 semaines	*			(Nwoko, 2014)
	HAP PHE + PYR : 50 + 50 mg.Kg ⁻¹)	maïs	F. mosseae	En pots (pollution artificielle)	60 jours		*	*	(Wu et al. 2011)
	HAP	ray-grass	F. mosseae	En pots (pollution	60 jours	Les biomasses	PHE > 99 %	*	(Yu et al.

Chapitre 2 : La phytoremédiation assistée par les champignons mycorhiziens à arbuscules

Pesticides	[(PHE + PYR) : 0, 50 + 50, 100 + 100 et 200 + 200 mg.Kg ⁻¹]			artificielle)		aériennes et racinaires diminuent avec l'augmentation des teneurs des polluants	PYR : 60-96 %		2011)
	HAP et alcanes (HAP : 1295 mg.Kg ⁻¹ sol et alcanes : 210 mg.Kg ⁻¹ sol)	blé (Triticum aestivum)	R. irregularis	En pots (sol historiquement pollué)	16 semaines	Différence non significative	* (18 % des HAP et 48 % des alcanes avec le blé mycorhizé)	* bioaccumulation sur les racines (5,7 % des HAP et 6,6 % des alcanes) transfert vers les tiges (0,4 % des HAP et 0,5 % des alcanes)	(Lenoir et al. 2016b)
	Atrazine (0,5, 2 et 5 mg.Kg ⁻¹)	maïs	F. caledonium	En pots (pollution artificielle)	4 semaines	Différence non significative	Différence non significative	augmentation de 132,4 à 260,5 % dans les racines diminution dans les tiges de 57,2 ; 31,3 ; 55,5 % avec l'augmentation des teneurs d'atrazine	(Huang et al. 2007)
	PCB (polychloro-biphényles) (475 µg.Kg ⁻¹)	ray-grass	F. caledonium	En pots (sol historiquement pollué)	180 jours	*	Diminution de 74,3 %	48,3 µg.Kg ⁻¹ dans les tiges et 273 µg Kg ⁻¹ dans les racines	(Lu et al. 2014)

* : supérieur en présence des plantes mycorhizées ; PHE : phénanthrène ; PYR : pyrène ; M : mycorhizé ; NM : non mycorhizé

L'un des freins qui limite l'usage de la phytoremédiation assistée par les CMA comme méthode biologique de réhabilitation des sols pollués est sa viabilité économique. Jusqu'à présent, les principales filières de valorisation de la biomasse produite sur sols pollués portent sur la production d'énergie et la fabrication de biomatériaux. Cependant, d'autres filières innovantes non-alimentaires de valorisation de la phytomasse sont à l'étude et en cours de développement. Il s'agit par exemple de la culture de plantes médicinales et aromatiques productrices d'HE qui sont largement utilisées dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et phytosanitaires. Ces domaines d'application sont dus principalement aux activités biologiques des HE (biocides, antioxydantes et anti-inflammatoires). Dans le Chapitre 3, nous détaillerons les principales filières de valorisation de la biomasse issue d'un sol pollué, les principales méthodes d'extraction des HE, les principes actifs à la base de leurs diverses activités biologiques, ainsi que leurs secteurs d'application et l'intérêt de leur encapsulation dans des cyclodextrines.

Chapitre 3 : Filière de valorisation de la biomasse produite sur sols pollués : production d'huiles essentielles

1. Introduction

Un des facteurs limitant l'usage de la phytoremédiation comme méthode de dépollution des sols contaminés est le devenir de la biomasse produite sur ces sols. Plusieurs filières non-alimentaires d'utilisation potentielle de la biomasse produite sur sols pollués sont actuellement en cours de développement (Bert et al., 2017 ; Delplanque et al., 2013). Dans un premier temps, la biomasse végétale subit une étape de prétraitement ayant pour objectif la réduction du volume de biomasse obtenue en enlevant l'excès d'eau, afin de faciliter le transport vers les sites de traitement. Suite à cela, la biomasse est transportée vers les sites de traitement (pyrolyse, incinération, gazéification, méthanisation, extraction liquide et production des biomatériaux).

1.1. Les processus de prétraitement

1.1.1. Le compostage

Le compostage est une technique qui consiste en la fermentation des déchets agricoles et en la récupération des éléments minéraux et de la matière organique. Cette technique réduit considérablement la biomasse tout en éliminant l'eau résiduelle, ce qui réduit le coût de transport vers les sites de traitement. Le compostage est un moyen relativement lent qui dure 2 à 3 mois et coûte 10 à 25 €/tonne de biomasse (Sas-Nowosielska et al., 2004).

1.1.2. Le compactage

Le compactage est le processus pendant lequel la biomasse végétale contaminée est tassée par pression, vibration ou percussion, à l'aide d'engins spéciaux couplés à un système de récupération du lixiviat. Ce dernier contient toujours des polluants et nécessite un traitement

ultérieur. Le volume de la biomasse résultante du compactage est moindre que celui obtenu par compostage. La biomasse végétale est ainsi plus compacte et facile à transporter vers les sites de traitement. Rares sont les études qui ont utilisé le compactage comme technique de prétraitement de la biomasse végétale produite sur les sols pollués. Les avantages du compactage sont similaires à ceux du compostage, mais elle est plus rapide.

1.2. Le dépôt direct de la biomasse végétale contaminée

Le dépôt direct de la biomasse végétale contaminée dans des sites d'élimination des déchets dangereux sans traitement semble être le moyen le plus simple et le plus rapide. Cependant, les inconvénients de cette filière sont les coûts d'application très élevés (135–1136 €/tonne de biomasse), le nombre limité des sites de décharge, ainsi que la réduction lente du volume de la biomasse contaminée (Sas-Nowosielska et al., 2004).

1.3. La pyrolyse

La pyrolyse est un processus qui consiste en la décomposition de la biomasse végétale en conditions anaérobies et sous l'effet de la chaleur, dans un système hermétiquement fermé. Les produits finaux de cette technique peuvent être classés en fraction solide (le char), une fraction gazeuse condensable (goudrons et huiles) et une fraction gazeuse non condensable. La réaction se déroule en 3 étapes (Lievens et al., 2008) :

- 1- Biomasse → Eau (humidité) + Résidus
- 2- Résidus → [Gaz + partie volatile]₁ + Char₁
- 3- Char₁ → [Gaz + partie volatile]₂ + Char₂

Selon la température et la vitesse réactionnelles utilisées, trois types de pyrolyse sont distingués (Demirbas, 2004) :

- la pyrolyse conventionnelle (ou lente) réalisée à des températures comprises entre 550 et 965 K, avec des vitesses de chauffage comprises entre 0,1 et 1 K/s ;
- la pyrolyse rapide réalisée à des températures comprises entre 850 et 1250 K, avec des vitesses de chauffage comprises entre 10 et 200 K/s ;
- la pyrolyse flash réalisée à des températures comprises entre 1050 et 1300 K, avec des vitesses de chauffage supérieures à 1000 K/s.

Cependant, à des températures et des vitesses réactionnelles élevées, la quantité de gaz formé augmente, alors que la quantité du char formé diminue. En conséquence, les polluants sont

volatilisés dans la phase gazeuse, ce qui nécessite des traitements ultérieurs. Pour pallier à ce problème, des températures et des vitesses modérées de la pyrolyse doivent être appliquées : les contaminants seront ainsi condensés dans le char, avec une émission gazeuse pauvre en polluants.

Les avantages de la pyrolyse se traduisent par la réduction importante du volume de la biomasse végétale polluée en comparaison avec celui obtenu avec le compostage et le compactage, ainsi que la concentration des polluants dans les fractions chars, tars et huiles. Ces dernières peuvent être utilisées comme biofuel, ou bien gazéifiées pour obtenir un gaz de synthèse. Par contre, la pyrolyse nécessite un coût d'installation et d'opération très important (Sas-Nowosielska et al., 2004).

1.4. L'incinération

L'incinération est une transformation exothermique en condition aérobie de la biomasse végétale, qui décompose la matière organique en CO_2 et H_2O tout en libérant de l'énergie. Les ETM sont soit libérés sous forme d'oxydes dans les fumées, soit condensés dans les cendres résiduelles (Ghosh et Singh, 2005). Les avantages majeurs de cette technique sont la récupération des contaminants, la réduction significative (plus de 90 %) de la biomasse polluée sous forme de cendres, de même que l'énergie libérée peut être utilisée pour la production de l'électricité et de la chaleur (chauffage). L'incinération est un processus rapide et applicable in situ. Le coût de cette technique varie entre 180 et 220 €/tonne de biomasse (Sas-Nowosielska et al., 2004).

1.5. La gazéification

La gazéification consiste en la conversion, sous l'action de hautes températures, de la matière première carbonée (biomasse végétale, char) en gaz tels que le dihydrogène (H_2), le monoxyde de carbone (CO), le dioxyde de carbone (CO_2) et de la vapeur d'eau (Emami Tabataba et al., 2012). Ces produits gazeux sont utilisés dans le secteur de production d'énergie. Le processus de gazéification de la biomasse dans un gazéificateur est un phénomène complexe : il s'agit de plusieurs étapes qui se produisent simultanément (séchage, chauffage, décomposition thermique (pyrolyse), gazéification, ainsi que des réactions chimiques de combustion) (Ghosh et Singh, 2005). Cette technique produit ainsi du char, de la cendre, ainsi que du goudron et des huiles, où les contaminants sont concentrés.

1.6. La méthanisation

La méthanisation consiste en la dégradation de la matière organique par les microorganismes en milieu anaérobie et contrôlé. Les produits finaux de cette technologie sont le « digestat », produit humide riche en matière organique, et le « biogaz », mélange gazeux saturé en eau composé de 50 % à 70 % de méthane, de 20 % à 50 % de CO₂ et de quelques gaz traces (NH₃, N₂, H₂S). Le biogaz ainsi produit est une source d'énergie renouvelable et pourrait être utilisée sous différentes formes : combustion pour la production d'électricité et de chaleur, production d'un carburant, ou injection dans le réseau de gaz naturel après épuration (ADEME, www.ademe.fr).

1.7. L'extraction liquide

L'extraction liquide des polluants de la biomasse végétale contaminée, repose sur l'ajout d'agents chélateurs, tel que l'EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique), afin d'extraire les ETM (tel que le Pb). C'est une technique bien efficace du fait que le polluant peut être séparé du chélateur qui sera réutilisé (Sas-Nowosielska et al., 2004).

1.8. L'agromine

L'agromine consiste en la culture des plantes hyperaccumulatrices pour l'extraction, la récupération et la transformation des ETM (As, Se, Cd, Cu, Co, La, Mn, Ni, Pb, Tl et Zn) du sol pour un usage industriel (Van Der Ent et al., 2015).

1.9. La production des biomatériaux

La biomasse issue de la phytoextraction d'un sol contaminé peut être utilisée dans le domaine de la production des biomatériaux bien que cette filière ne soit actuellement que peu développée. Les principaux produits fabriqués à partir de la biomasse contaminée sont le bois [*Eucalyptus camaldulensis*, *Paulownia tomentosa* (Gerhardt et al., 2017)], les fibres [*Boehmeria nivea* (Yang et al., 2010)] et les solvants [*Brassica napus* pour la production d'éthanol (Dhiman et al., 2016)].

1.10. La production d'HE

La production d'HE est une filière innovante de valorisation de la biomasse végétale obtenue sur des sols pollués (Angelova et al., 2016 ; Yan-hui et al., 2014 ; Zheljazkov et al.,

2006). Les plantes médicinales et aromatiques peuvent être utilisées dans le processus de phytoremédiation des sols et constituent une source importante d'HE. Or, le transfert des contaminants, tels que les ETM, dans les HE est limité et persistent au niveau des tissus végétaux lors des processus d'extraction (distillation) (Asgari Lajayer et al., 2017 ; Jisha et al., 2017 ; Lal et al., 2013 ; Zheljaskov et al., 2008). Ceci constitue un avantage important de cette méthode de valorisation pour l'utilisation de ces huiles sans risque de contamination (Asgari Lajayer et al., 2017). En effet, et grâce à la diversité et à l'abondance de leurs principes actifs, les HE présentent diverses activités biologiques et sont utilisées dans un large secteur d'applications.

2. Huiles essentielles

Par définition, une HE est « un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'HE est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » (définition adoptée par la pharmacopée européenne).

Les HE sont des liquides concentrés et hydrophobes de composés aromatiques (odoriférants) et volatils produites par des plantes aromatiques. Elles sont synthétisées dans les fleurs (jasmin, rose, violette, lavande), les bourgeons (girofle), les feuilles (thym, eucalyptus, sauge), les fruits (anis, anis étoilé), l'écorce (cannelle), le zeste (agrumes), les graines (cardamome), le bois (santal), le rhizome et les racines (gingembre) des plantes aromatiques. Ces dernières appartiennent généralement à un nombre restreint de familles : Lamiaceae, Lauraceae, Asteraceae, Rutaceae, Myrtaceae, Poaceae, Cupressaceae et Piperaceae. Les HE sont stockées dans des cellules sécrétoires, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques et des trichomes glandulaires. Elles constituent une source importante de composés à activités biologiques (antibactériennes, antifongiques, antioxydantes, anti-inflammatoires, etc.) (Bakkali et al., 2008 ; Raut et Karuppayil, 2014) et elles sont largement utilisées dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires.

2.1. Méthodes d'extraction

Afin d'extraire les HE à partir de la matière végétale, plusieurs techniques d'extraction sont adoptées. Elles impliquent divers procédés d'extraction, conventionnels et innovants (Asbahani et al., 2015 ; Azmir et al., 2013 ; Tongnuanchan et Benjakul, 2014), dont par exemple :

2.1.1. Extraction par distillation

2.1.1.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est la technique de séparation des HE la plus ancienne et la plus répandue. Elle est devenue la méthode standard d'extraction d'HE à partir d'un matériel végétal. Le processus implique l'immersion complète de la matière végétale dans l'eau bouillante. La vapeur d'eau engendrée entraîne avec elle les HE. Le mélange est condensé à l'aide d'un réfrigérant et l'HE est récupérée après sa séparation de la fraction aqueuse (Figure 6). Cette méthode permet la protection des HE extraites du fait que les gouttelettes d'huile sont englobées dans l'eau servant de barrière contre le surchauffage.

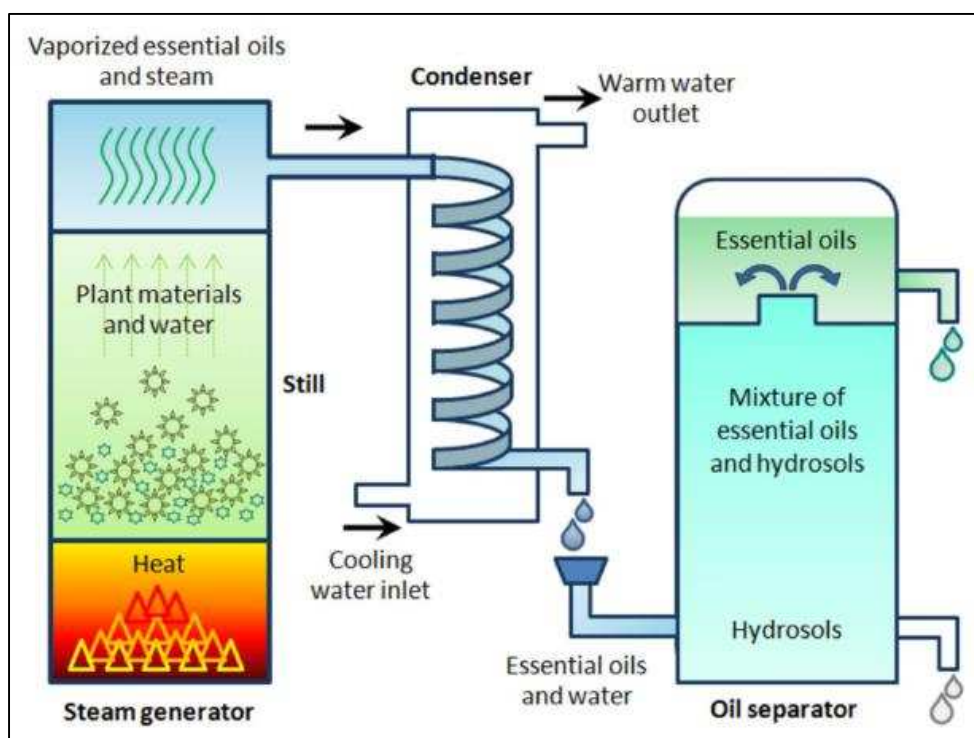


Figure 6 : Schéma explicatif de l'hydrodistillation (Tongnuanchan et Benjakul, 2014)

2.1.1.2. Distillation à la vapeur

Cette technique de distillation consiste à libérer les HE contenues dans la matière végétale sous l'action de la vapeur d'eau. En effet, cette dernière engendre des ruptures au niveau de la

structure cellulaire végétale et en libère les HE. La figure 7 représente le mode d'action de la distillation à vapeur. Le système est composé d'une source de chaleur servant à l'ébullition de l'eau. La vapeur d'eau ainsi produite traverse la matière végétale qui se trouve au-dessus de la source de vapeur. Un mélange d'huile et de vapeur en résulte, qui sera par la suite condensé dans un réfrigérant puis séparé. L'HE pure est alors récupérée à la fin de la réaction.

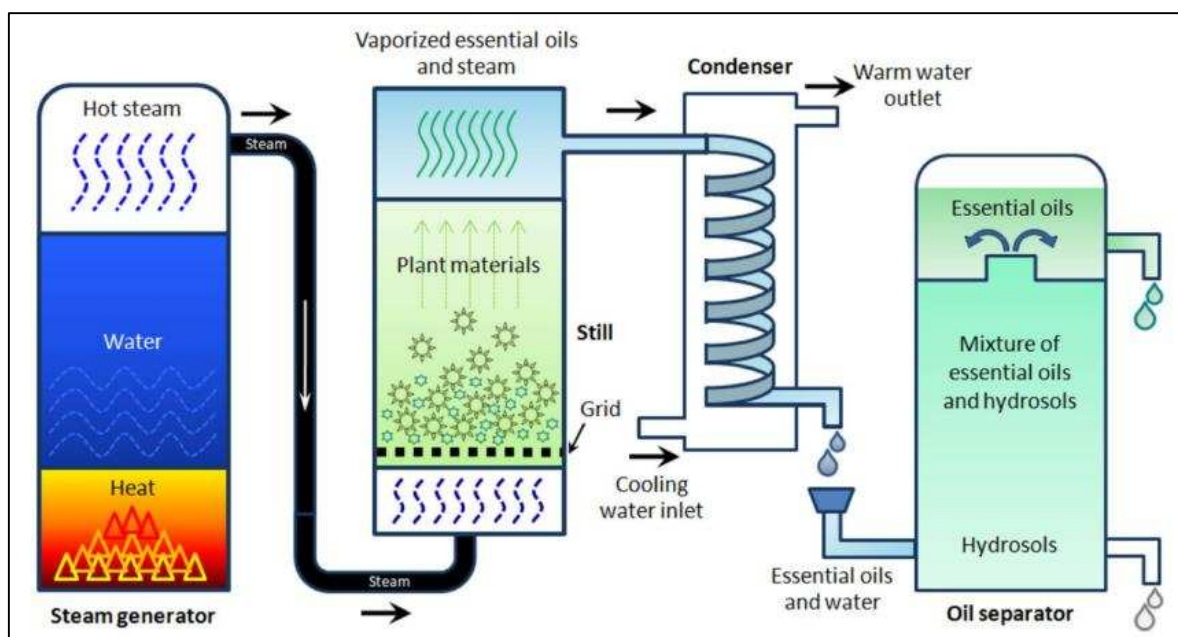


Figure 7 : Schéma explicatif de la distillation à la vapeur (Tongnuanchan et Benjakul, 2014)

2.1.1.3. Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une forme de distillation à la vapeur, qui diffère des autres systèmes de distillation par la voie d'entrée de la vapeur. En effet, la vapeur d'eau est introduite par le haut et traverse la matière végétale. La condensation du mélange de vapeur contenant l'huile se produit sous la grille retenant la matière végétale. Le procédé peut également être utilisé sous basse pression ou sous vide, ce qui réduit la température de la vapeur au-dessous de 100 °C. Cette méthode est plus avantageuse que les autres moyens d'extraction du fait que moins de vapeur est nécessaire pour l'extraction totale des HE, le temps réactionnel est moindre (15 min contre 3 h pour l'hydrodistillation) et le rendement en huile est plus important. L'hydrodiffusion est une technique écologique : elle consomme moins d'énergie et il n'en résulte pas de résidus d'eau ou de solvants.

2.1.2. Extraction par solvant

L'extraction par solvant conventionnelle est une technique d'extraction des HE à partir des matériaux fleuris fragiles ou délicats (jasmin, jacinthe, narcisse, tubéreuse) qui ne tolèrent pas la chaleur de la distillation, tout en utilisant des solvants organiques. Différents solvants, y compris l'acétone, l'hexane, l'éther de pétrole, le méthanol ou l'éthanol peuvent être utilisés. Le processus d'extraction consiste en premier temps à mélanger le matériel végétal avec le solvant, suivi d'une étape de chauffage, puis filtration. Ensuite, le filtrat ainsi obtenu est concentré par évaporation du solvant. Le concentré est constitué principalement de résine (résinoïde) et d'un mélange cireux appelé « concrète » composé de cire, de parfum et d'HE. Cette dernière est séparée du mélange sous l'action de l'alcool pur par une distillation à basse température et une HE concentrée est obtenue suite à l'évaporation de l'alcool. Cependant, l'extraction par solvant est un processus relativement long, ce qui rend les HE ainsi obtenues plus chers que celles résultantes d'autres méthodes d'extraction et il faut noter que des traces de solvants peuvent toujours y persister.

2.1.3. Extraction aux fluides supercritiques

Un fluide atteint son état hypercritique dans des conditions bien définies : pression critique (P_c) et température critique (T_c). Dans cet état, le fluide possède une faible viscosité, une forte diffusivité et une densité proche de celle de son état liquide.

Le CO_2 est le solvant le plus utilisé pour l'extraction des HE. En effet, le CO_2 supercritique atteint facilement son point critique (faibles $P_c = 72.9$ bar et $T_c = 31.2$ °C). Il est non agressif, chimiquement inerte, non toxique et non inflammable. D'autre part, il est disponible en haute pureté avec un coût relativement faible et l'élimination de ses traces à partir de l'extrait obtenu se réalise par une simple dépression.

2.1.4. Extraction par micro-ondes

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques dont la fréquence est comprise entre 300 MHz et 30 GHz avec une longueur d'onde comprise entre 1 cm et 1 m. Généralement, la fréquence des micro-ondes utilisée est de 2450 MHz, ce qui correspond à une longueur d'onde de 12,2 cm. L'utilisation de ces micro-ondes dans le processus d'extraction des HE est une technique innovante. C'est une technique verte qui économise l'énergie et la durée d'extraction et elle réduit également la consommation des solvants. Diverses variantes de procédés d'extraction des HE sont développées, dont l'hydrodistillation assistée par micro-

ondes, l'extraction par micro-ondes sans solvant, la distillation à vapeur accélérée ou non par micro-ondes. Cette filière peut être appliquée à l'échelle industrielle (Filly et al., 2014).

2.1.5. Extraction sous pression

La méthode d'extraction sous pression à froid consiste à soumettre la matière végétale sous une grande pression mécanique, à froid ce qui génère une émulsion aqueuse. L'huile est ensuite récupérée par centrifugation.

2.1.6. Extraction par ultrasons

L'extraction des HE par ultrasons consiste à exposer le matériel végétal à des ondes comprises entre 20 KHz à 100 MHz. Les ultrasons traversent les parois végétales et entraînent avec elles les composés organiques et inorganiques. Ce mécanisme implique deux principaux types de phénomènes physiques : la diffusion à travers la paroi cellulaire et le rinçage du contenu cellulaire après la rupture des parois. L'efficacité de l'extraction par ultrasons est gérée par la teneur en humidité de l'échantillon, le degré de broyage et la taille des particules. En outre, la température, la fréquence et le temps de sonication sont des facteurs importants. Les avantages de cette technique consistent en la réduction du temps d'extraction, de l'énergie consommée et de la non-utilisation de solvant.

2.1.7. Enfleurage

L'enfleurage est une technique d'extraction des HE utilisée en parfumerie. Cette méthode consiste en l'extraction des HE contenues dans les fleurs fraîches et fragiles (jasmin, tubéreuse, violette) en utilisant de la graisse animale capable d'adsorber les huiles. La matière grasse saturée est traitée à l'alcool afin d'en extraire les huiles.

2.2. Principes actifs des HE

Les HE sont des mélanges complexes de principes actifs parfois nombreux et présents à différentes concentrations. Généralement, une HE est composée d'un mélange de 20 à 60 principes actifs dont 2 ou 3 sont majoritaires (20 % - 70 %) et sont à l'origine des activités biologiques du mélange, les autres composés étant généralement présents sous formes de traces. Par exemple, les principes actifs majeurs de l'HE d'*Origanum compactum* sont le carvacrol (30 %) et le thymol (27 %) ; l'HE de *Coriandrum sativum* contient 68 % de linalol alors que le menthol (59 %) et le menthone (19 %) sont majoritaires dans l'HE de

Chapitre 3 : Filière de valorisation de la biomasse produite sur sols pollués : production d'huiles essentielles

Mentha piperita (revue de Bakkali et al., 2008). Les principes actifs des HE sont classés, selon leur nature, en terpènes (monoterpènes et sesquiterpènes), terpenoïdes (isoprénoides) et composés aromatiques (aldéhyde, alcool, phénol) (Figure 8 et Tableau 7).

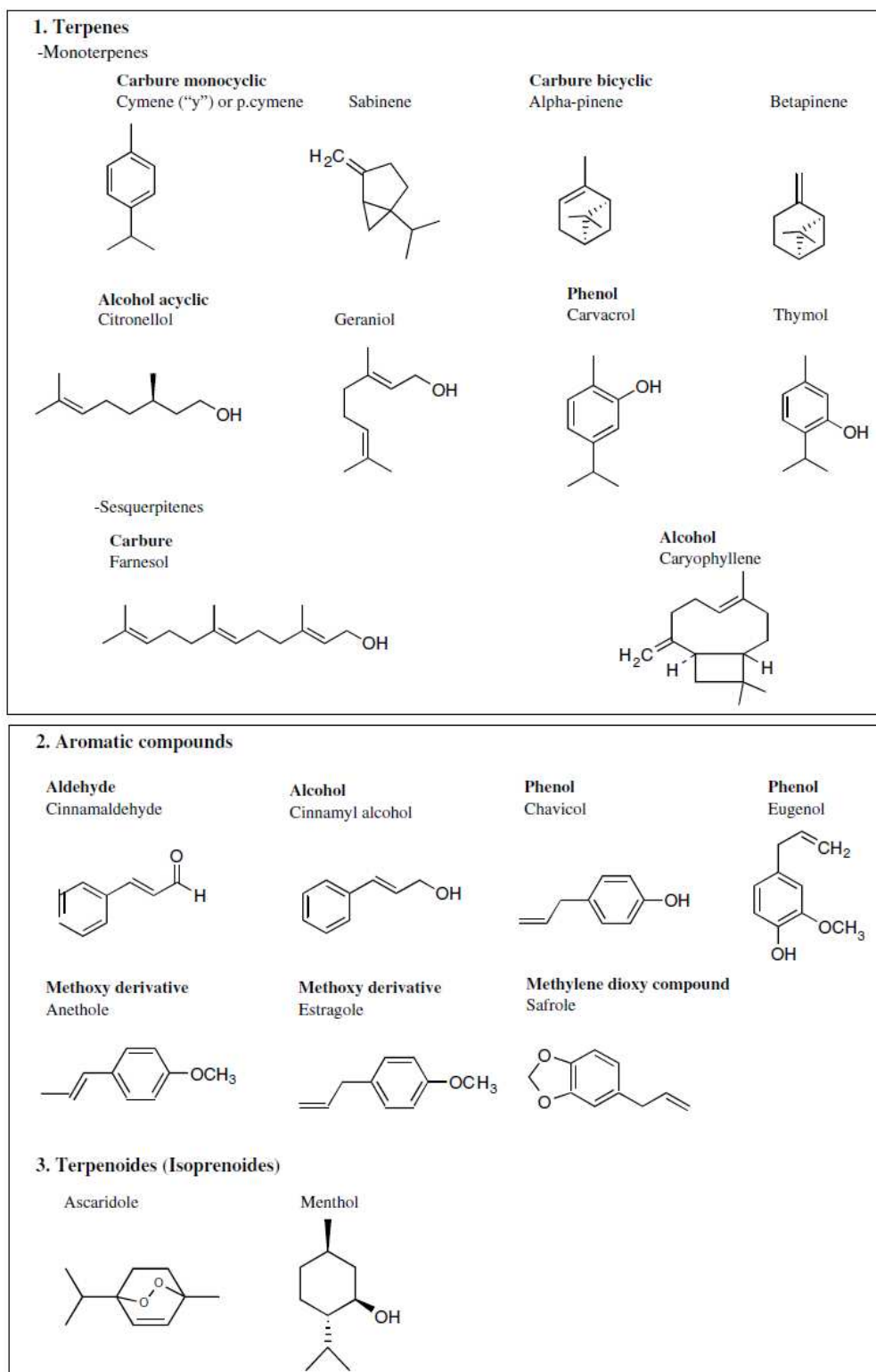


Figure 8 : Structures chimiques de certains composés actifs des HE (Bakkali et al., 2008)

Tableau 7 : Classification des principes actifs des HE (adapté de Bakkali et al., 2008 ; Tongnuanchan et Benjakul, 2014)

Classe	Sous classe	Principes actifs	Exemples
Terpènes - composés d'une polymérisation d'une molécule de base : l'isoprène (C₅H₈) - formés à partir d'isopentényl-pyrophosphate (IPP) Terpenoïdes (isoprénoïdes) - Un terpène contenant un atome d'oxygène	Monoterpènes - Composés de 2 unités d'isoprène (C₁₀) - Composés majeurs de 90 % des HE	Carbures : - acyclique : mycènes, ocimène - monocyclique : terpinènes, p-cimène, phellandrènes - bicyclique : pinènes, -3-carene, camphène, sabinène Alcools : - acyclique : géraniol, linalol, citronellol, lavandulol, nérol - monocyclique : menthol, α-terpinéol, carvéol. - bicyclique : bornéol, fenchol, chrysanthénol, thuyan-3- ol Aldéhydes : acyclique : géraniol, néral, citronellal Cétone : - acyclique : tegetone - monocyclique : menthone, carvone, pulégone, piperitone - bicyclique : camphor, fenchone, thuyone, ombellulone, pinocamphone, pinocarvone Esters : - acyclique : linalyl acetate, propionate, citronellyl acetate - monocyclique : menthyl, α-terpinyl acetate - bicyclique : isobornyl acetate Ethers : 1,8-cineole, menthofurane Peroxydes : ascaridole Phenols : thymol, carvacrol	L'angélique, la bergamote, le carpe, le céleri, la citronnelle, la coriandre, l'eucalyptus, le géranium, le genévrier, le lavandin, la lavande, le citron, la citronnelle, la mandarine, la menthe, l'orange, la menthe poivrée, le pin, le romarin, la sauge, le thym.

	Sesquiterpènes - Composés de 3 unités d'isoprène (C15)	Carbures : azulène, β -bisabolène, cadinènes, β -caryophyllène, logifolène, curcumènes, elemènes, farnesènes, zingibèrene Alcools : bisabol, cedrol, b-nerolidol, farnesol, carotol, β -santalol, patchoulol, viridiflorol Cetones : germacrone, cis-ongipinan-2,7-dione, β -vetinone, turmérone Epoxide : caryophyllène oxyde, humulène epoxydes	
Composés aromatiques - Dérivés de phénylpropane - Moins fréquents que les terpènes		Aldéhyde : cinnamaldéhyde Alcool : cinnamon alcool Phénol : chavicol, eugénol Dérivés méthoxylés : anéthol, élémicine, estragol, méthyleugénol Composés méthylènedioxy : apiol, myristicine, safrole	L'anis, la cannelle, la girofle, le fenouil, la noix de muscade, le persil, le saffran, l'anis étoilé, l'estragon et certaines familles botaniques (Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Rutaceae)

2.3. Activités biologiques des HE

Les activités biologiques des HE dépendent largement de l'espèce végétale dont l'huile est extraite, de la composition chimique des huiles et de l'abondance relative de ses principes actifs. En effet, des principes actifs tels que les terpènes, les phenylpropanes, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, les tannins, les cumarins, les glycosides et les acides organiques, confèrent aux HE leurs activités biologiques : antibactériennes, antifongiques, antioxydantes et anti-inflammatoires (da Cruz Cabral et al., 2013 ; Miguel, 2010 ; Naidu, 2000).

2.3.1. Activité antibactérienne

Le mécanisme d'action des HE comme agents antibactériens n'est pas clairement élucidé. Plusieurs études attribuent les propriétés antibactériennes des HE à leur caractère lipophile et à leur capacité à traverser les membranes bactériennes et ainsi passer à l'intérieur de la cellule où elles inhibent les propriétés fonctionnelles (revue de Calo et al., 2015).

Par exemple, le carvacrol, principe actif majeur des HE d'origan (60 % à 74 %) et de thym (45 %), est connu pour son pouvoir antibactérien contre une large gamme de bactéries Gram-positifs et Gram-négatifs. Le carvacrol altère la membrane externe des bactéries Gram-négatifs, libérant des lipopolysaccharides et augmentant la perméabilité de la membrane cytoplasmique à l'ATP. Il réagit avec les membranes des bactéries Gram-positifs et modifie leur perméabilité pour les cations H^+ et K^+ (revue de Ankri et Mirelman, 1999). La perturbation de la perméabilité membranaire induit la mort cellulaire bactérienne. Les bactéries Gram-positifs semblent être plus sensibles à la présence d'HE que les bactéries Gram-négatifs. En effet, les HE entrent en contact direct avec la membrane cytoplasmique des bactéries Gram-positifs, contrairement aux bactéries Gram-négatifs qui sont plus résistantes à cause de leur membrane externe riche en lipopolysaccharides (Marzoug et al., 2011).

Plusieurs études ont évalué le pouvoir antibactérien des HE. Par exemple, l'HE d'Eucalyptus oleosa présente une activité antibactérienne contre des souches à Gram-positifs (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*) et Gram-négatifs (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Escherchia coli*, *Klebseilla pneumoniae*) (Marzoug et al., 2011). Ainsi, l'HE extraite des fleurs de *Citrus aurantium* L. inhibent la croissance des bactéries Gram-positifs (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Listeria*

monocytogenes) et Gram-négatifs (*Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*) (Ben Hsouna et al., 2013). Les travaux de Baydar et Sa (2004) montrent que les HE extraites de l'Origan (*Origanum minutiflorum* et *Origanum onites*), du thym (*Thymbra spicata*) et de la sarriette (*Satureja cuneifolia*), présentent des activités antibactériennes importantes contre *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* et *Yersinia enterocolitica*.

2.3.2. Activité antifongique

L'activité antifongique des HE se déroule suivant 6 mécanismes d'action principaux (Lagrouh et al., 2017) :

- 1- inhibition de la formation de la paroi fongique due à l'inhibition de la synthèse de ses composés principaux : β -glucanes et chitines ;
- 2- altération de l'intégrité membranaire : l'ergostérol est un composant essentiel de la membrane cellulaire fongique. Les HE peuvent se lier à l'ergostérol, ou inhiber sa synthèse. Par conséquent, des pores au niveau de la membrane cellulaire fongique apparaissent, ce qui entraîne un déséquilibre dans l'environnement interne de la cellule et induit la mort cellulaire ;
- 3- dysfonctionnement de l'activité mitochondriale dû à l'inhibition des transporteurs d'électrons et des pompes à protons, ce qui induit une réduction de la synthèse de l'ATP et la mort cellulaire ;
- 4- inhibition de la division cellulaire suite à l'inhibition de la polymérisation des microtubules, ce qui affecte la formation du fuseau mitotique ;
- 5- inhibition de la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines ;
- 6- inhibition des pompes d'efflux, transporteurs membranaires dont le rôle est de transporter des substances toxiques hors de la cellule.

Plusieurs études ont évalué les activités antifongiques des HE de diverses espèces végétales contre une large gamme de champignons pathogènes. Par exemple, l'HE de *Citrus aurantium* L. inhibe la croissance des souches d'*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum*, *Rhizopus nigricans*, *Alternaria alternata* (Ben Hsouna et al., 2013). D'autres travaux ont également montré une activité antifongique de l'oignon (*Allium cepa* L.) vis-à-vis des souches de *Rhodotorula glutinis*,

Candida tropicalis, *Aspergillus niger*, *Monascus purpureus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium cyclopium* et *Fusarium oxysporum* (Benkeblia, 2004 ; Ye et al., 2013). De même, l'activité antifongique de l'ail (*Allium sativum* L.) a été évaluée contre plusieurs champignons pathogènes tels que *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans*, ainsi que d'autres souches de *Candida*, *Trichophyton*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* et *Trichosporon* (Ankri et Mirelman, 1999 ; Benkeblia, 2004 ; Corzo-Martínez et al., 2007).

2.3.3. Activité antioxydante

Les espèces réactives de l'oxygène, sont des molécules dérivées de l'oxygène rendues chimiquement très réactives par la présence d'électrons de valence non appariés. Elles peuvent être d'origine endogène (métabolisme de l'oxygène au niveau de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique et des membranes plasmiques et nucléaires) ou exogène (suite à l'exposition des polluants, drogues, tabac, irradiations). En effet, en faibles quantités, les ERO, y compris $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{HO}^\bullet$, HO_2 et H_2O_2 , jouent le rôle des messagers dans la prolifération, la différenciation et de l'apoptose cellulaires (Ye et al., 2015). En revanche, la production excessive et non contrôlée des ERO engendre des altérations au niveau des protéines, des lipides, des enzymes et de l'ADN. Par conséquent, les ERO constituent une cause principale de diverses pathologies telles que le vieillissement, le cancer, l'artériosclérose, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, l'asthme, le diabète ainsi que des maladies cardiovasculaires et immunitaires (Lushchak, 2014 ; Raut et Karuppayil, 2014). Au niveau cellulaire, l'accumulation des ERO est contrôlée par des systèmes de défense antioxydants, enzymatiques [SOD, catalase, glutathion S-transférase (GST) et peroxyrédoxine (Prx)] et non enzymatiques (vitamines C et E, caroténoïdes, flavonoïdes) (Ye et al., 2015). La régulation des mécanismes de production et d'élimination des ERO peut être perturbée suite à (i) des hauts niveaux d'agents oxydants (endogènes et exogènes) stimulant la production des ERO ; (ii) l'épuisement des réserves d'antioxydants cellulaires ; (iii) l'inactivation des enzymes antioxydantes et (iv) l'inhibition des systèmes de défense antioxydantes, ce qui induit un stress oxydatif. Une alimentation riche en antioxydants est donc nécessaire afin de combler ce déficit. Les HE riches en flavonoïdes, terpenoïdes et composés phénoliques sont recommandées. En effet, plusieurs études ont évalué l'activité antioxydante des HE dont celles extraites des feuilles d'*Aegle marmelos*, d'*Ocimum sanctum* (Reshma et al., 2014) et de *Syzygium cumini* (Mohamed et al., 2013). De même, les activités

antioxydantes de l'angélique (*Angelicae dahuricae*) (Piao et al., 2004) et de l'oignon (*Allium cepa* L.) (Prakash et al., 2007 ; Ye et al., 2013) ont été analysées. Dans sa revue, Miguel (2010) a compilé les travaux sur les propriétés antioxydantes des HE évaluées suivant diverses méthodes d'analyses, dont celles extraites de *Lavandula angustifolia*, *Thymus vulgaris* L., *Eugenia caryophyllus* (C. Spreng) Bull et Hare, *Ocimum basilicum* L., *Dodecadenia grandiflora* Nees, *Lindera pulcherrima* Nees, *Myrtus communis* var. *italica* L., *Hymenocrater longiflorus* Benth., *Salvia eremophila* Boiss, *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz) Ietswaart, *Crithmum maritimum* L.

2.3.4. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réaction de défense du système immunitaire induite par une agression externe (infection, traumatisme, brûlure, allergie) ou interne (cellules cancéreuses). En effet, les HE qui agissent comme antioxydant possèdent aussi des pouvoirs anti-inflammatoires. La réponse anti-inflammatoire est une stimulation oxydative qui a lieu principalement dans les monocytes, les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages. Au cours de la phagocytose, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (RNS pour reactive nitrogen species) sont impliquées dans la neutralisation des pathogènes et dans les mécanismes de défense. En revanche, la surproduction de ces espèces engendre des altérations au niveau du site d'inflammation en contribuant à la peroxydation lipidique et par conséquent à la destruction des membranaires et des organites cellulaires (Kumar et al., 2013 ; Miguel, 2010). L'activité anti-inflammatoire des HE est due à leur capacité à piéger les radicaux libres et aussi à leurs interactions dans les cascades de signalisation impliquant les cytokines, les facteurs de transcription et l'expression des gènes pro-inflammatoires. Les mécanismes d'action consistent en (revue de Miguel, 2010) :

- 1- l'inhibition de la lipoxycgénase et de la cyclooxygénase, enzymes catalytiques de la voie de métabolisation dans les cellules de l'acide arachidonique (acide gras insaturé associé aux phospholipides membranaires), en leucotriènes et prostaglandines. Les prostaglandines amplifient la douleur et améliorent la perméabilité vasculaire. De même, les leucotriènes améliorent la perméabilité vasculaire et mènent à des réponses allergiques et pro-inflammatoires. Des HE comme celles extraites d'*Aloe barbadensis* Miller, *Illicium verum* Hook, *Citrus aurantium* subsp. *bergamia* (Risso) Wight & Arn., *Cinnamomum zeylanicum*, *Eucalyptus globulus* Labill., *Juniperus communis* L.,

Lavandula officinalis Chaix & Kitt, *Thymus vulgaris* L. sont impliquées dans cette voie d'inhibition ;

- 2- l'inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'Interleukine-1 β (IL- β) (par les monocytes, macrophages, fibroblastes) et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α pour tumor necrosis factor- α) (par les monocytes, macrophages, neutrophiles). La production de ces cytokines est induite suite à une infection bactérienne et est inhibée par les HE telles que celles extraites de *Phaseolus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Cordia verbenacea* D. C., *Carum carvi* L., *Gardenia jasminoides* Ellis, *Cuminum cyminum* L., *Laurus nobilis* L., *Coriandrum sativum* L., *Trigonella foenum-graecum* L., *Cinnamomum zeylonicum* Blume, *Salvia officinalis* L., *Apium graveolens* L., *Thymus vulgaris* L ;
- 3- l'inhibition de l'expression des gènes médiateurs de l'inflammation tels que les cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6), la cyclooxygénase (COX-2). Des HE de *Farfugium japonicum* (L.) Kitamura, *Illicium anisatum* L., *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr et Perry, *Juniperus oxycedrus* L. inhibent l'expression de ces gènes.

2.4. Domaines d'application

Les HE sont principalement utilisées dans les secteurs pharmaceutiques, agroalimentaires et cosmétiques.

2.4.1. Domaine pharmaceutique

Les HE sont des composants essentielles de divers médicaments, dont le DOLIRHUME aux HE®, BALSOFUMINE MENTHOLEE®, EUVANOL®, AROMASOL® (traitements d'appoint dans les états congestifs des voies aériennes supérieures), DIGEFIT®, HEPATOFLOLINE® (troubles digestifs), BOLCITOL® (faciliter les fonctions d'élimination rénales et digestives), LUMBALGINE® (douleur musculaire et tendinologique).

D'autre part, l'utilisation médicale des HE dans les soins ou les cures est appelée « l'aromathérapie ». Une fois inhalée, l'HE agit comme des signaux biologiques détectés par les récepteurs olfactifs. Le signal est transmis ainsi vers le système limbique du cerveau et l'hypothalamus via le bulbe olfactif. Le cerveau libère des neurotransmetteurs tels que la sérotonine et l'endorphine. L'aromathérapie est utilisée en massage et en psychologie du fait que certaines HE telles que celles extraites de pépins de raisin, d'amande, du jojoba et du romarin sont connues pour leurs pouvoirs relaxants et calmants (Ali et al., 2015).

2.4.2. Domaine agro-alimentaire

La conservation des denrées alimentaires contre la dégradation pendant la production, le stockage et la commercialisation, par des microorganismes est une problématique importante, en raison de l'augmentation des maladies d'origine alimentaire qui menacent la santé humaine. L'usage des additifs et des conservateurs chimiques sont à l'origine de diverses maladies auto-immunes et d'allergies (Kralova et Sjöblom, 2009 ; Lerner et Matthias, 2015). Les additifs alimentaires et les conservateurs à base de composés naturels tels que les HE constituent un moyen alternatif prometteur afin de remplacer les produits chimiques. Dans leur revue, Calo et al. (2015) donnent des exemples des propriétés des HE extraites d'origan, du thym, du citron, de la cannelle et de la sauge aptes à inhiber la croissance des agents pathogènes dans la viande, les fruits et les légumes.

Par ailleurs, les pesticides conventionnels synthétiques utilisés en agriculture pourraient être nocifs aussi bien pour la santé humaine que pour l'environnement. D'où l'intérêt de les substituer par des produits naturels, à base d'HE par exemple. En effet, les HE peuvent être potentiellement utilisées comme des biopesticides grâce à leurs effets biocides (antibactériens, antifongiques), insecticides, antiappétants et répulsifs, anti-oviposition (Tableau 8) (Koul et al., 2008).

2.4.3. Domaine cosmétique

Les HE sont largement utilisées dans le domaine de l'industrie cosmétique. Elles sont impliquées dans la fabrication des crèmes, des shampoings, des savons et des parfums. Grâce à leurs activités biologiques, les HE peuvent être utilisées pour lutter contre les poux et les pellicules (Raut et Karuppayil, 2014 ; Yorgancioglu et Bayramoglu, 2013). De même, elles peuvent servir à la protection des produits cosmétiques contre les agents pathogènes tels que les espèces d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp. et *Bacillus* sp. Ces microorganismes causent des altérations des produits cosmétiques au niveau de l'odeur, de la viscosité et de leur efficacité, qui peuvent causer une abrasion, une irritation, une allergie et une toxicité cutanée suite à la production des toxines par les agents pathogènes (Yorgancioglu et Bayramoglu, 2013).

Tableau 8 : Exemples de travaux d'utilisation des HE comme biopesticides

Mode d'action	HE extrait de	Principes actifs	Organisme cible	Maladie	Expérience réalisée	Concentration des HE	Principaux résultats	Références
Fongicide	Ocimum basilicum	linalool (34,93 %)	Pilidiella granati	pourriture des fruits	in vitro in vivo	100-2000 $\mu\text{L.L}^{-1}$	- inhibition de la germination des conidies - inhibition du développement fongique - in vivo, efficacité pour O. vulgare et O. basilicum	(Thomidis et Filotheou, 2016)
	Origanum vulgare	carvacrol (63,03 %)						
	Rosmarinus officinalis	eucalyptol (15,24 %)						
	Rosmarinus officinalis	eucalyptol (26,28 %)						
	Salvia officinalis	eucalyptol (50,77 %)						
	Lippia origanoides	thymol (71,1 %)	Gloeophyllum trabeum	pourriture brune (brown root)	in vitro	100, 50, 25 et 12,5 %	- inhibition de la croissance fongique - activité plus importante pour L. origanoides	(de Medeiros et al., 2016)
	L. lacunosa	linalool (38,7 %)						
	Syzygium aromaticum	eugenol (81,6 %)	Trametes versicolor	pourriture blanche (white rot)				
	Thymus leptobotrys	carvacrol (76,94 %)	Penicillium digitatum, Penicillium italicum	pourriture verte et bleue (green and blue molds)	in vitro	250-500-1000-2000 $\mu\text{L.L}^{-1}$	- inhibition de la croissance fongique (inhibition 100% obtenue avec T. leptobotrys et T. riatarum à 1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$) - inhibition de la germination des spores (efficacité prononcée pour T. leptobotrys)	(Boubaker et al., 2016)
	Thymus satureioides subsp. pseudomastichina	borneol (27,71 %), thymol (18,47 %)						
	Thymus broussonnetii subsp. hannonis	camphor (46,17 %), terpineol (7,69 %)	Geotrichum citri-auranti	pourriture aigre (sour rot)				
	Thymus riatarum	carvacrol (32,24 %), terpinène (19,60 %), p-cymene (13,52 %)						

Chapitre 3 : Filière de valorisation de la biomasse produite *sur sols pollués* : *production d'huiles essentielles*

	Melissa officinalis	p-mentha-1,2,3-triol (13,1 %), P-menth-3-en-8-ol (8,8 %), pulegone (8,8 %), piperitynone oxide (8,4 %) et 2-piperitone oxide (7,3 %)	Botrytis cinerea, Penicillium expansum Rhizopus stolonifer	pourriture grise penicillium rot rhizopus rot	in vitro	0,25–2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	- inhibition de la croissance fongique par ordre de sensibilité : P. expansum > R. stolonifer > B. cinerea	(El Ouadi et al., 2017)
Insecticide	Salvia aucheri subsp. Blancoana (cultivé et sauvage)	camphor (26,6–57,3 %), camphène (6,3–22 %), α -pinène (4,1–20,6 %) et (E)-caryophyllène (5,4–5,7 %)	Tribolium castaneum	ravageurs des produits stockés	par contact direct	0,39, 0,78, 1,17 et 1,57 $\mu\text{L/cm}^2$	LD50 : 1,25 et 1 $\mu\text{L/cm}^2$ LD90 : 2,03 et 1,72 $\mu\text{L/cm}^2$ (cultivé et sauvage)	(El Abdouni Khiyari et al., 2014)
	Rhododendron thymifolium	germacrone (20,83 %), γ -elemène (11,10 %), selina-3,7(11)-diene (6,18 %), α -oxobisabolène (5,39 %), β -sesquiphellandène (2,44 %), β -elemenone (35,17 %), Z,Z,Z-1,5,9,9-tetramethyl-1,4,7,-cycloundecatriene (3,64 %)	Liposcelis bostrychophila Tribolium castaneum	ravageurs des produits stockés	par contact direct	gamme de concentrations	LD50 : 18,72 $\mu\text{g/cm}^2$ contre L. bostrychophila LD50 : 29,82 $\mu\text{g/adulte}$ contre T. castaneum	(Liang et al., 2016)
	Eugenia sulcata	β -caryophyllène (24,6 %) α -pinène (17,2 %) β -pinène (10,9 %)	Dysdercus peruvianus Oncopeltus fasciatus	prédateur de coton (graines et fibres)	par contact direct	500, 250, 125, 62,5 et 31,2 mg d'HE/mL`	80 % et 96,67 % de mortalité obtenues avec les HE pures de D. peruvianus et O. fasciatus respectivement	(Gonzalez et al., (2014)

Chapitre 3 : Filière de valorisation de la biomasse produite sur sols pollués : production d'huiles essentielles

	Salvia veneris	1,8 cineole (30,4 %) camphor (18,4 %) camphene (12,9 %) α -pinène (8,2 %), borneol (5,8 %) β -pinène (5 %)	Spodoptera exigua	ravageurs des produits stockés	par contact direct	1 μ L (10 % HE)/larve	contact 63 % pour 100 μ L/mL	fumigation 100 %	(Polatoğlu et al., 2017)
			Sitophilus granarius		par fumigation	10 μ L	70 %	97,6 %	
			S. oryzae				71,5 %	100 %	
			Tribolium castaneum				32,8 %	Pas d'effet	
			T. confusum				53,5 %	Pas d'effet	
			Rhyzopertha dominica				67,1 %	Pas d'effet	
			Oryzaephilus surinamensis				81,6 %	90,8 %	
Répulsif	Murraya tetramera M. euchrestifolia M. koenigii M. kwangsiensis M. exotica M. alata	α -cedrène (4,22–21,82 %), β -caryophyllène (8,15–27,73 %), γ -elemène (4,38–12,65 %), γ -selinène (3,80–21,09 %), α -selinène (2,60–10,68%), α -zingiberène (2,08–12,68 %), spathulenol (3,08–11,80 %) caryophyllene oxide (1,58–10,59 %), β -eudesmol (1,33–25,32 %)	Tribolium castaneum	ravageurs des produits stockés		78,63, 15,73, 3,15, 0,63 et 0,13 nL/cm ²	activités répulsives les plus efficaces obtenues avec les HE extraites de M. tetramera et M. kwangsiensis		(You et al., 2015)
	Artemisia vulgaris	1,8-cineole (46,50 %) borneol (10,17 %) piperitol (9,52 %) α -cadinène (8,92 %) camphor (6,22 %) humulène (5,47 %) 1,4-cineole (4,25 %)	Tribolium castaneum	ravageurs des produits stockés		2, 4, 6, 8 et 10 μ L	activité répulsive à partir de 0,6 μ L.mL ⁻¹		(Wang et al., 2006)

Chapitre 3 : Filière de valorisation de la biomasse produite sur sols pollués : production d'huiles essentielles

Anti-oviposition	Apium graveolens Citrus sinensis Eucalyptus globulus Juniperus oxycedrus Laurus nobilis Lavandula hybrida Mentha microphylla Mentha viridis Ocimum basilicum Origanum vulgare Pistacia terebinthus Rosmarinus officinalis Thuja orientalis		Acanthosceli des obtectus	ravageurs de Phaseolus vulgaris		10 µL HE	- mâles plus sensibles que les femelles - HE les plus toxiques pour les ♂ sont : M. microphylla et M. viridis HE les plus toxiques pour les ♀ sont : L. hybrida et R. officinalis.	(Papachristos et Stamopoulos, 2002)
	Acorus tatarinowii Heracleum hemsleyanum Stemona japonica		Bemisia tabaci	ravageurs des cultures et des plantes ornementales		0,1 mL d'une solution 1000 ppm	A. tatarinowii est l'HE le plus efficace (jusqu'à 95 %), suivi de H. hemsleyanum et S. japonica	(Wagan et al., 2016)
Anti-appétant	Lavandula luisieri	1,8-cineole fenchone camphor 5-methylene-2,3,4,4-tetramethylcyclopent-2-enone	Spodoptera littoralis Leptinotarsa decemlineata Myzus persicae	ravageurs des cultures			L. decemlineata et M. persicae plus sensibles	(González-Coloma et al., 2006)
	Eucalyptus camaldulensis Callistemon viminalis	p-cymen (18,86 %) alpha-pinène (16,56 %), alloaromadendrène (12,26 %), 1,8-cineole (11,79 %) 1,8-cineole (41,26 %), alpha-pinène (15,01 %), limonene (10,45 %), alpha-terpineol (10,30 %)	Tribolium confusum	ravageurs des graines et des farines stockées		750 - 2500 ppm	diminution significative des indices nutritionnels (relative growth rate (RGR), relative consumption rate (RCR), efficiency of conversion of ingested food (ECI) and feeding deterrence index (FDI)	(González-Coloma et al., 2006)

3. Intérêt de l'encapsulation

Les HE sont des composés volatils, hydrophobes, très sensibles, à faibles biodisponibilité et solubilité dans le milieu aqueux, ce qui augmente leur perte par évaporation, par dégradation et par oxydation, limitant ainsi leur efficacité. Pour pallier à ces problèmes, l'encapsulation de ces huiles paraît une solution prometteuse. En effet, l'encapsulation consiste à piéger les huiles dans des molécules hôtes telles que les cyclodextrines. Ces dernières sont des oligosaccharides cycliques à cavité hydrophobe et à surface hydrophile, qui complexent les HE et augmentent leurs biodisponibilités, les protègent contre les agressions du milieu extérieur, diminuent leur volatilité et assurent leur libération prolongée et contrôlée (Kfoury et al., 2016). La molécule de cyclodextrine est appelée alors « molécule hôte », la molécule d'HE à encapsuler est dite « invité » et l'ensemble forme un complexe d'inclusion (Figure 9).

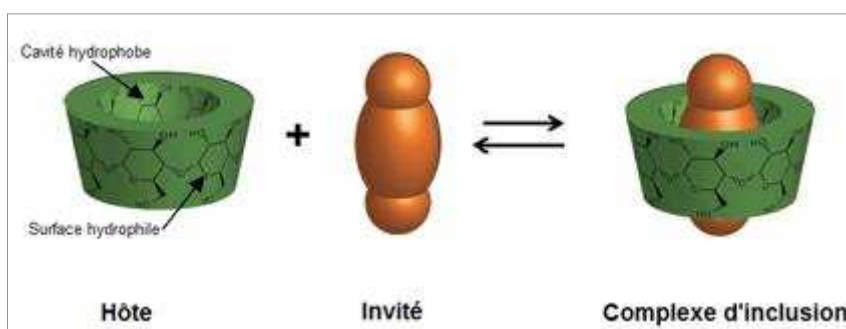


Figure 9 : Schéma représentatif de la formation d'un complexe d'inclusion (cyclodextrines/HE)
(Source : S. Fourmentin, UCEIV, ULCO)

Dans sa revue, Marques, (2010) décrit le processus de formation du complexe d'inclusion (cyclodextrine/invité), suivant 5 étapes :

- 1- suite au rapprochement de l'invité, les molécules d'eau (polaires) sont libérées de la cavité de la cyclodextrine (apolaire) ;
- 2- l'invité hydrophobe se débarrasse de la couche d'hydratation qui l'enveloppe ;
- 3- l'invité s'insère dans la cavité des cyclodextrines formant ainsi un complexe d'inclusion qui est stabilisé par des interactions de Van der Waals, interactions hydrophobes et/ou par des liaisons hydrogènes ;
- 4- les molécules d'eau libres se réarrangent et forment des liaisons hydrogènes entre elles ;
- 5- la structure de l'eau est restaurée autour de l'invité non complexé.

L'encapsulation des HE par les cyclodextrines est un processus utilisé dans les domaines pharmaceutiques, agroalimentaires et cosmétiques. Dans le domaine pharmaceutique, l'usage des cyclodextrines a pour objectif d'améliorer la solubilité, la biodisponibilité et les effets thérapeutiques des médicaments à base des HE ou de leurs principes actifs. Elles permettent ainsi de transporter ces médicaments vers les sites biologiques cibles et masquent leurs odeurs et goûts indésirables (Brewster et Loftsson, 2007 ; Del Valle, 2004 ; Loftsson et al., 2005). En agroalimentaire, leur utilisation permet principalement la stabilisation et la protection des huiles contre l'oxydation, la chaleur et la lumière, l'élimination ou la réduction des odeurs et l'augmentation des temps de vie des aliments (Astray et al., 2009 ; Szente et Szejtli, 2004). De même, en cosmétique, les cyclodextrines sont utilisées pour protéger certains parfums, couleurs et vitamines, pour accroître la solubilité des produits, pour commercialiser les produits huileux sous forme de poudre, pour assurer la libération contrôlée des ingrédients (parfumerie), pour réduire l'irritation cutanée et contrôler l'adsorption cutanée de certains composés (Marques, 2010).

Chapitre 3 : Filière de valorisation de la biomasse produite sur sols pollués : production *d'huiles essentielles*

La contamination des sols agricoles de la Bekaa par les eaux usées du fleuve du Litani est une problématique préoccupante au niveau national. En effet, les taux de pollutions alarmants de l'eau du fleuve, présentent un risque de transfert des contaminants vers les sols et par la suite vers les plantes cultivées et vers l'homme via la chaîne alimentaire, d'où la nécessité d'éliminer ces polluants du sol. Parmi les méthodes de remédiation des sols contaminés, la phytoremédiation assistée par les CMA fait partie des méthodes écologiques émergentes. Bien d'être écologique, facile *à mettre en œuvre, acceptable par l'opinion publique*, un des facteurs limitant de cette phytotechnologie est le devenir de la biomasse obtenue sur le sol pollué. La rentabilité socio-économique de ce mode de gestion pourrait être exploitée par la culture des plantes aromatiques productrices des HE. Ces dernières connaissent un large secteur d'utilisation grâce à leur composition en principes actifs. D'où, le premier objectif de cette thèse est de caractériser un sol expérimental de la Bekaa irrigué par les eaux polluées du Litani et d'évaluer ses risques de toxicité vis-vis de l'homme et de son environnement. Dans un deuxième temps, la phytoremédiation assistée par les CMA a été testée en utilisant une plante aromatique, l'origan, *Origanum syriacum L.* Cette dernière est une plante aromatique locale bien connue pour ses usages thérapeutiques et médicinaux. Elle est répandue sur tout le pourtour *du bassin méditerranéen, pousse à l'état sauvage sur le littoral ainsi qu'aux hautes altitudes, et est protégée par le décret No. 1/340 (1996) du ministre de l'Agriculture* dans le but de contrôler la collecte et la vente de cette espèce. L'efficacité de cette méthode en réduire les taux de contamination du sol, ainsi que le transfert et l'impact de la pollution sur la composition des HE ont été évalués. Et finalement, les activités biologiques des HE [antifongiques (contre un champignon phytopathogène, *Fusarium culmorum*)], antioxydantes et anti-inflammatoires ont été examinées.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

1. Site expérimental

Cette étude a été conduite sur une parcelle de 200 m² (10 m x 20 m) localisée dans la région de la Bekaa centrale (Liban), plus précisément dans le bassin supérieur du Litani. Elle se situe à Marj (latitude: 33,766404 ; longitude: 35,876819), sur les rives du Litani dont les eaux constituent une source essentielle d'irrigation des zones cultivées, principalement pendant la saison sèche (Avril - Novembre). Sur cette parcelle, la betterave, les céréales (blé - orge), la pomme de terre et le cornichon ont été cultivés en alternance. Après une pause de clôtures sur le site expérimental, 9 quadrats de 1 m² ont été délimités pour servir de points d'échantillonnage (Figure 10). Les échantillons de sol ont été prélevés au sein du premier horizon (0 à 25 cm de profondeur), en septembre 2015 et conservés à 4 °C.

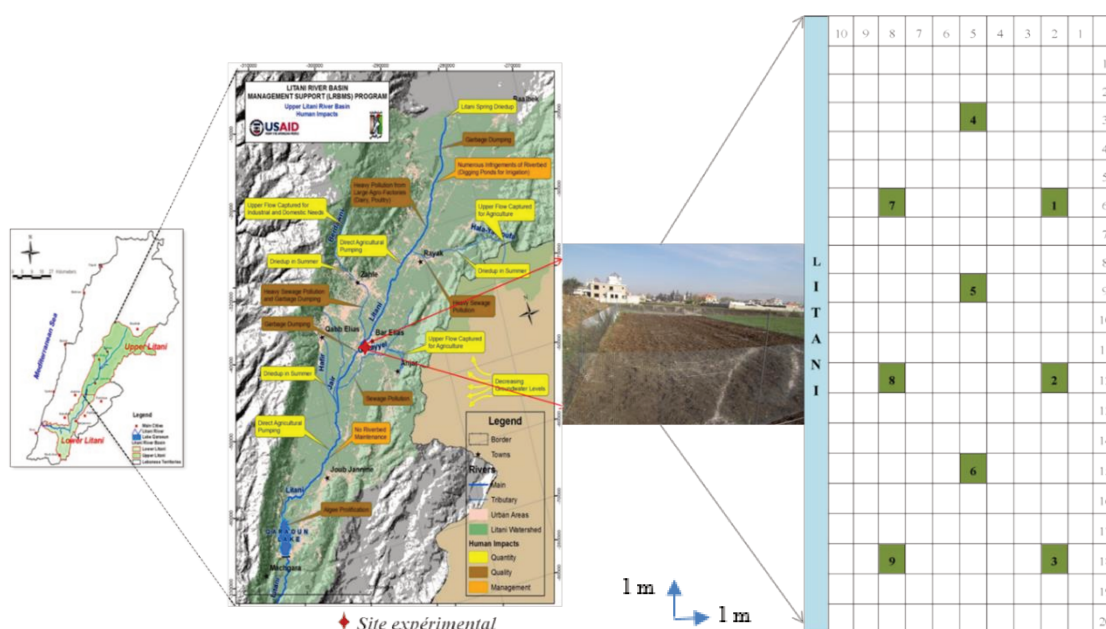


Figure 10 : Site expérimental : localisation et délimitation des quadrats, sites d'échantillonnage

2. Caractérisation physico-chimique du sol

2.1. Caractérisation pédo-agronomique

Les analyses des caractéristiques pédo-agronomiques du site expérimental ont été réalisées au sein du Laboratoire d'Analyse des Sols d'Arras - INRA (www.inra.fr, Arras, France) selon des normes AFNOR et ISO.

2.1.1. Structure du sol

Les particules du sol sont classées, selon leur taille, en 5 catégories : argiles ($< 2 \mu\text{m}$), limons fins ($2 \mu\text{m}$ à $20 \mu\text{m}$), limons grossiers ($20 \mu\text{m}$ à $50 \mu\text{m}$), sables fins ($0,05 \text{ mm}$ à $0,2 \text{ mm}$) et enfin sables grossiers ($0,2 \text{ mm}$ à 2 mm). La granulométrie du sol est déterminée selon la norme NF X 31107. La prise d'essai est de 10 g, tamisée à 2 mm et dont la matière organique est détruite sous l'action de l'eau oxygénée (H_2O_2). La détermination des fractions les plus fines ($< 50 \mu\text{m}$) est réalisée au moyen de 3 prélèvements successifs à la pipette de Robinson, dans une suspension de sol en cours de sédimentation. La fraction des sables fins est séparée par tamisage à $50 \mu\text{m}$ et sous un courant d'eau de la suspension après prélèvements des fractions fines. La dispersion finale est réalisée par un court passage aux ultrasons après addition du dispersant $[(\text{NaPO}_3)_6 + \text{Na}_2\text{CO}_3]$.

Les pesées après évaporation et séchage des fractions prélevées à la pipette permettent de déterminer les proportions des différentes classes granulométriques.

2.1.2. pH du sol

Le pH du sol est mesuré après mise en suspension de l'échantillon du sol séché à l'air dans l'eau dans un rapport 1:5 (sol/solution). La méthode utilisée est celle de la norme ISO 10390. La prise d'essai est de 10 g.

2.1.3. Carbone (C) organique et azote (N) total

La méthode d'analyse du carbone organique repose sur la transformation de la totalité du carbone présent dans l'échantillon du sol en dioxyde de carbone (CO_2), sous l'action de la chaleur (1000°C environ) et en présence d'oxygène. Après séparation chromatographique, la quantité de gaz carbonique formée est quantifiée au moyen d'un catharomètre (conductibilité

thermique). La prise d'essai est d'environ 50 mg d'échantillon broyé à 250 μm . Le protocole suit la norme NF ISO 10694.

La teneur en azote organique et minéral de l'échantillon est déterminée en le chauffant à environ 1000 °C en présence d'oxygène. Cette combustion réduit l'azote du sol en azote moléculaire (N_2). Les quantités de N_2 formées sont quantifiées, après séparation chromatographique, au moyen d'un catharomètre. La prise d'essai est d'environ 50 mg d'échantillon broyé à 250 μm . Le protocole suit la norme NF ISO 13878.

2.1.4. Calcaire (CaCO_3) total

L'échantillon à analyser est acidifié en milieu fermé par une solution d'acide chlorhydrique. En présence de carbonates, il y a dégagement de dioxyde de carbone dont le volume est mesuré. La prise d'essai est comprise entre 0,5 et 10 g d'échantillon broyé à 250 μm . En tenant compte de la masse de la prise d'essai, le volume du CO_2 dégagé est convertit en teneur de CaCO_3 exprimée en g.Kg^{-1} . La méthode utilisée est celle décrite par la norme NF ISO 10693.

2.1.5. Phosphore (P_2O_5)

L'extraction du phosphore est réalisée par un réactif constitué de NaHCO_3 à 0,5 mol.L^{-1} tamponnée à pH 8,5 par NaOH , selon un rapport d'extraction de 1:20 (m/v). Le dosage du phosphore extrait s'effectue par spectrophotométrie à 825 nm après développement de la coloration d'un complexe phosphomolybdique. La procédure utilisée est décrite dans la norme NF ISO 11263. La prise d'essai est de 2,5 g de sol broyé à 2 mm.

2.1.6. Ca, Mg, Na, K, Fe, Mn, Al échangeables à la cobaltihéxammine

L'ion cobaltihéxammine ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$) est capable de s'échanger facilement avec les cations des sols (Ca, Mg, Na, K, Fe, Mn, Al). Cette technique consiste à traiter 2,5 g d'échantillon broyé à 2 mm en présence de 50 mL de solution de cobaltihéxammine à 50 $\text{mmol}^+.\text{L}^{-1}$ (millimoles de charges positives par litre). Les cations échangeables sont mesurés en solution après filtration par ICP-AES (inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry). La méthode est décrite dans la norme NF ISO 23470 (Ciesielski et Sterckeman, 1997 ; Orsini et Remy, 1976).

2.2. Analyse des polluants

2.2.1. Analyse des ETM

La méthode d'analyse des ETM consiste à faire réagir 0,25 g de sol séché, broyé et tamisé à 2 mm avec de l'acide perchlorique et l'acide fluorhydrique selon les normes NF X 31-147. Les teneurs en Al, Ba, Cr, Cu, Na, Ni, Fe, V, Zn, K, As, Co, Mg et Mn ont été mesurés par ICP-AES, alors que les concentrations de Pb, Cd, Tl et Mo ont été mesurées par ICP-MS.

2.2.2. Analyse des hydrocarbures aliphatiques

L'extraction des hydrocarbures aliphatiques (alcanes) est réalisée selon Rahman et al. (2003) (modifié). 5 g de sol par échantillon sont mis en présence de 20 mL d'hexane. Après 1 h de repos à température ambiante, les échantillons sont mélangés au vortex pendant 1 min puis mis dans un bain à ultrasons pendant 10 min. Ensuite, et afin d'éliminer les substances polaires, 1,5 g de gel de silice 60 (60-200 μm) sont ajoutés pour chaque échantillon qui est agité pendant 10 min dans un agitateur horizontal (Gerhardt). Le surnageant est transféré dans un nouveau tube puis évaporé dans l'évaporateur centrifuge (AVC 2-25 CD plus-Christ) à froid et repris dans 100 μL d'Hexane dans des capillaires.

L'analyse des alcanes est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (SHIMADZU 2010 Plus system) couplée à la spectrométrie de masse (SHIMADZU QP 2010 Ultra). La séparation est exécutée en mode FAST sur une colonne capillaire Zebron Phenomenex ZB-5MS composé de 5 % Polysilarylène – 95 % Polydimethylsiloxane (longueur 10 m, diamètre interne 0,1 mm, épaisseur de la phase 0,1 μm).

L'injection a été réalisée en mode SPLIT (ratio 80) sous un débit de gaz vecteur (Hélium) à vitesse linéaire de 60 cm/s. La température initiale du four est de 65 °C ; elle augmente progressivement à 260 °C avec une vitesse de 45 °C/min puis avec une vitesse de 30 °C/min pour atteindre 290 °C et enfin à 320 °C avec une vitesse de 15 °C/min où elle est maintenue pendant 1,5 min. La durée d'analyse est 8,8 min par échantillon pour un volume d'injection de 0,5 μL .

La détection en masse est réalisée par impact électronique (70 eV ; 280 °C pour la source ionique et 300 °C pour la ligne de transfert) en modes SCAN (de 35 à 600 m/z et à 20000 Hz) et SIM (Single Ion Monitoring) afin de détecter chaque pic pendant 0,05 s. Le débit du dihydrogène est de 40 mL/min alors que le débit de l'air est de 400 mL/min.

Tableau 9 : Tableau représentant les ions cibles pour les alcanes

Alcanes	m/z ion cible	m/z ion référence1	m/z ion référence2	Temps de rétention (en min)
Octane	114	57	85	0,578
Nonane	128	57	41	0,757
Décane	142	43	71	0,998
Undécane	156	43	71	1,284
Dodécane	170	43	71	1,588
Tridécane	184	43	71	1,892
Tetradécane	198	43	71	2,186
Pentadécane	212	43	71	2,469
Hexadécane	226	43	71	2,739
Heptadécane	240	43	71	2,998
Pristane	268	71	43	3,004
Octadécane	254	43	71	3,242
Phytane	267	71	43	3,257
Nonadécane	268	43	71	3,476
Eicosane	282	71	43	3,699
Heneicosane	296	71	43	3,914
Docosane	310	43	71	4,119
Tricosane	324	71	43	4,317
Tetracosane	338	71	43	4,51
Pentacosane	352	71	43	4,706
Hexacosane	366	71	43	4,908
Heptacosane	380	71	43	5,11
Octacosane	394	71	43	5,315
Nonacosane	408	71	43	5,523
Triacontane	422	71	43	5,748
Hentriacontane	436	71	43	5,987
Dotriacontane	450	71	43	6,239
Titriacontane	57	71	43	6,506
Tetratriacontane	57	71	85	6,783
Pentatriacontane	57	71	43	7,071
Hexatriacontane	57	71	85	7,366
Heptatriacontane	57	71	85	7,692
Octatriacontane	71	44	57	8,073

L'identification des alcanes a été réalisée grâce à la comparaison des spectres obtenus à la bibliothèque spectrale NIST11s. Un standard commercial contenant 35 alcanes (C8-C40 Alkanes Calibration Standard, Supelco, Bellefonte, USA) a permis la quantification des alcanes.

2.2.3. Analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

L'extraction des HAP a été réalisée à partir de 10 g de sol par échantillon dans une cartouche Soxhlet en acétate de cellulose. L'extraction a été réalisée selon la technique dite du « Soxhlet » par recyclage de 120 mL de dichlorométhane à 70 °C pendant 16 h (60 min par cycle) (Verdin et al., 2006). Le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif et l'échantillon est repris dans 1 mL de dichlorométhane.

L'analyse des HAP est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (SHIMADZU 2010 Plus system) couplée à la spectrométrie de masse (SHIMADZU QP 2010 Ultra). La séparation est exécutée en mode FAST sur une colonne capillaire Zebron Phenomenex ZB-5MS composé de 5 % Polysilarylène – 95 % Polydimethylsiloxane (longueur 10 m, diamètre interne 0,1 mm, épaisseur de la phase 0,1 µm).

L'injection en GC a été réalisée en mode SPLIT (ratio 80) sous un débit de gaz vecteur (Hélium) à vitesse linéaire de 60 cm/s. La température initiale du four est maintenue à 70 °C pendant 0,25 min ; elle augmente progressivement à 150 °C avec une vitesse de 60 °C/min puis avec une vitesse de 30 °C/min pour atteindre 310 °C où elle est maintenue pendant 3 min. La durée d'analyse est 9,65 min par échantillon pour un volume d'injection de 0,5 µL.

La détection en masse est réalisée par impact électronique (70 eV ; 280 °C pour la source ionique et 300 °C pour la ligne de transfert) en modes SCAN (de 35 à 325 m/z et à 20000 Hz) et SIM (Single Ion Monitoring) afin de détecter chaque pic pendant 0,03 s.

Le débit du dihydrogène est de 40 mL/min alors que le débit de l'air est de 400 mL/min.

L'identification des HAP a été réalisée grâce à la comparaison des spectres obtenus à la bibliothèque spectrale NIST11s. Une analyse d'un standard commercial contenant 16 HAP de la liste de l'US-EPA (SV Calibration Mix, Restek, Bellefonte, USA) a permis la quantification des HAP.

Tableau 10 : Tableau représentant les ions cibles pour les HAP

HAP	m/z ion cible	m/z ion référence1	m/z ion référence2	Temps de rétention (en min)
Naphtalène	128	127	129	1,668
Acénaphthylène	152	151	76	2,545
Acénaphthène	153	154	152	2,632
Fluorène	166	165	82	2,968
Phénanthrène	178	176	89	3,762
Anthracène	178	89	176	3,787
Fluoranthène	202	101	200	4,745
Pyrène	202	101	200	4,972
Benzo[a]Anthracène	228	226	114	5,972
Chrysène	228	226	113	6,033
Benzo[b]Fluoranthène	252	126	250	6,858
Benzo[k]Fluoranthène	252	126	250	6,875
Benzo[a]Pyrène	252	126	253	7,177
Indeno[1,2,3-c,d]Pyrène	278	276	138	8,335
Dibenzo[a,h]Anthracène	278	276	139	8,671
Benzo[g,h,i]Perylène	276	138	137	8,795

2.2.4. Analyse des dioxines et furannes

L'analyse des dioxines (PCDD) et furannes (PCDF) a été réalisée dans le Laboratoire d'Analyse des Sols d'Arras - INRA. 17 congénères de PCDD/F ont été analysés selon la méthode décrite par l'EPA (EPA, 2007). Les PCDD/F sont extraits à partir de 10 g de sol broyé et tamisé à 2 mm au toluène par Accelerated Solvent Extraction (ASE) à chaud (50 °C) et sous pression (103 bars), pendant 5 min. Après purification sur colonnes de silice multicouche et charbon actif, l'extrait est concentré à 200 µL. Les teneurs en PCDD/F sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse munie d'un détecteur de spectrométrie de masse à haute résolution (GC/HRMS). Chaque PCDD/F est identifié par deux ions moléculaires caractéristiques et leur temps de rétention. La toxicité individuelle vis-à-vis la santé humaine est estimée en utilisant le facteur d'équivalence toxique (TEQ pour toxic equivalency factor) proposé par WHO (World Health Organization) (Van den Berg et al., 2006).

2.2.5. Pesticides

111 congénères de pesticides ont été analysés par Micropolluants Technologie SA, Metz. L'extraction, l'identification et la quantification de ces congénères ont été réalisées par GC-MS-MS/GC-MSD selon les normes XP X33-012.

2.3. Tests d'écotoxicité

2.3.1. Test de germination des graines

30 graines de blé (*Triticum aestivum* L. var. orventis), trèfle (*Trifolium pratense* L.), luzerne (*Medicago sativa* L.), fétuque (*Festuca arundinacea* Schreb.) et ray-grass (*Lolium perenne* L.) ont été semées dans des boîtes de Pétri contenant 30 g de sol pollué du site expérimental, sol témoin de la Bekaa non irrigué des eaux du Litani et du terreau. 3 réplicats ont été réalisés par condition et l'expérience a été menée à 25 °C et à l'obscurité. Le taux de germination est calculé après 2, 4, 7 et 10 jours.

2.3.2. Quantification de la microflore tellurique

Les acides gras associés aux phospholipides (AGPL) sont utilisés comme des biomarqueurs lipidiques spécifiques pour la détection et la quantification de la microflore tellurique (Tableau 11). Les AGPL C16:1 ω 5 et C18:2 ω 6,9 sont des biomarqueurs spécifiques des CMA et des champignons saprotrophes et ectomycorhiziens respectivement. La biomasse bactérienne est estimée par les AGPL i15:0, a15:0, i16:0, i17:0 et a17:0 pour les bactéries Gram-positifs et cy17:0, C18:1 ω 7 et cy19:0 pour les bactéries Gram-négatifs.

La technique d'extraction des acides gras du sol a été exécutée selon Frostegård et al. (1991) et Labidi et al. (2015).

○ Première étape : Extraction

3 grammes de sol lyophilisé sont mises dans des tubes à essai (25 mL) en présence de 10 mL de la solution d'extraction Bligh & Dyer (250 mL de chloroforme + 500 mL de méthanol + 200 mL de tampon citrate). Le mélange est agité au vortex et laissé au repos pendant 2 h à température ambiante. Après 2 h, les échantillons sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est transféré dans un grand tube à essai en verre (50 mL).

Le sol restant est rincé avec 5 mL de la solution d'extraction, vortexé pendant 15 s et centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. Le surnageant obtenu est rajouté au premier, auxquels 4 mL de chloroforme et 4 mL de tampon citrate sont ajoutés. Les échantillons sont laissés

toute la nuit à température ambiante. Le lendemain, la phase inférieure contenant les lipides est transférée dans un tube à essai (15 mL) et évaporée sous azote à 40 °C.

○ Deuxième étape : Isolement des fractions lipidiques

Cette étape débute par conditionnement des colonnes SPE (500 mg de Silice) avec (2×3 mL d'Hexane) et 3 mL de chloroforme. La matière sèche de chaque échantillon est dissoute dans (3×1 mL) de chloroforme avant d'être mise dans la colonne SPE.

Les différentes classes de lipides sont séparées comme suit :

- les lipides neutres avec 5 mL de chloroforme ;
- les glycolipides avec 10 mL d'acétone ;
- les phospholipides avec 5 mL de méthanol.

Chaque type de lipide est récupéré dans un tube. Les glycolipides sont jetés. Les échantillons sont évaporés sous azote à 40 °C.

○ Troisième étape : Trans-estérification

Un volume de 20 µL de standard interne, l'acide nonadécanoïque C19:0, méthylé (0,25 µg/µL) - soit 5 µg - est ajouté à chaque échantillon et est évaporé sous azote. Les échantillons secs sont repris dans 1 mL de toluène/méthanol (v:v) auxquels 1 mL de potasse méthalonique (0,2 M) est ajouté. Les échantillons sont ensuite incubés à 37 °C dans un bain-marie pendant 15 min. Après refroidissement pendant 20 min, 2 mL d'hexane/chloroforme (4:1), 0,3 mL d'acide acétique (1 M) et 2 mL d'eau ultra-pure sont ajoutés. Le mélange est vortexé puis centrifugé à 3000 rpm pendant 5 min.

Deux phases sont obtenues, la phase supérieure de chaque échantillon est transférée à un tube à essai avec une pipette Pasteur et évaporée sous azote à froid.

○ Quatrième étape : Passage en GC-MS

Les échantillons secs sont dilués dans 100 µL d'hexane et repris dans des capillaires afin de les passer en GC-MS.

L'analyse des acides gras est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (SHIMADZU 2010 Plus system) couplée à la spectrométrie de masse (SHIMADZU QP 2010 Ultra). La séparation est exécutée en mode FAST sur une colonne capillaire Zebron Phenomenex ZB-ZB-Wax composé de 100 % polyéthylèneglycol (longueur 10 m, diamètre interne 0,1 mm, épaisseur de la phase 0,1 µm).

L'injection en GC est réalisée en mode SPLIT (ratio 200) sous un débit de gaz vecteur (Hélium) à vitesse linéaire de 37 cm/s. La température initiale du four est de 175 °C ; elle augmente progressivement à 275 °C avec une vitesse de 25 °C/min. La durée d'analyse est de 4,5 min par échantillon pour un volume d'injection de 0,5 µL.

La détection en masse est réalisée par impact électronique (70 eV ; 250 °C pour la source ionique et 280 °C pour la ligne de transfert) en modes SCAN (de 50 à 400 m/z et à 20000 Hz) et SIM (Single Ion Monitoring) afin de détecter chaque pic pendant 20 s.

Tableau 11 : Tableau représentant les ions cibles pour les acides gras

Acide Gras	m/z ion cible	m/z ion reference1	m/z ion référence2	Temps de rétention (en min)
i15:0	256	74	199	1,828
a15:0	256	74	199	1,851
i16:0	270	74	227	2,116
C16:1 ω 5	268	74	199	2,19
i17:0	284	74	199	2,43
a17:0	284	74	199	2,456
cy17:0	250	74	208	2,498
C18:2 ω 6,9	294	74	268	2,754
C18:1 ω 7	296	74	264	2,795
cy19:0	310	278	74	3,143
C19:0 (standard interne)	312	74	199	3,185

La température du détecteur FID (Flame Ionisation Detector) est de 300 °C. Le débit du dihydrogène est de 40 mL/min alors que le débit de l'air est de 400 mL/min.

L'identification des PLFA a été réalisée grâce à la comparaison des spectres obtenus à la bibliothèque spectrale NIST11s. L'analyse d'un standard commercial (Bacterial Acide Methyl Ester CP Mix in methyl coproate – SUPELCO (10 mg/mL) a permis de vérifier les conditions analytiques. Chaque acide gras est quantifié grâce à l'introduction d'un standard interne (C19:0 méthylé).

2.3.3. Isolement et identification des CMA dans le sol

Les spores des CMA sont extraites à partir de 100 g de sol séché en utilisant la méthode de tamisage humide décrite par Gerdemann et Nicolson (1963). Le sol est tamisé à 250, 125 et 40 μ m sous un jet d'eau, afin de séparer les spores des CMA selon leur taille. Le sol récupéré sur chaque tamis est examiné sous une loupe binoculaire. Les spores isolées ont été classées selon leur morphotype (taille, couleur, hyphes) et montées dans du PVLG (polyvinyl alcohol-lacto-glycerol) avec ou sans le réactif de Melzer. Les spores ont été identifiées par Pr. Yolande Dalpé, Centre de Recherches de l'Est sur les Céréales et les Oléagineux, Ottawa – Canada, selon leurs critères morphologiques et en se basant sur les identifications fournies

par Blazkowski (Blaszkowski, 2012) et des sites spécifiques <http://invam.caf.wvu.edu> et <http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/index.htm>. L'abondance des spores est évaluée en comptant le nombre des spores identifiées.

2.3.4. Biodiversité végétale

2.3.4.1. Inventaire floristique

L'inventaire floristique de la parcelle expérimentale a été exécuté au printemps 2016. L'identification des plantes a été exécutée selon les études de Mouterde (1966-1970-1983). Pour l'ensemble des espèces identifiées dans chaque quadrat, des coefficients d'abondance-dominance et de sociologie de Braun-Blanquet leur sont attribués.

Les relevés sont traduits en indices de composition : les indices de Menhinick (1964) et de Margaleff (1958) qui traduisent à la fois la diversité spécifique et l'abondance des individus d'un groupe biologique étudié ; les indices de diversité de Shannon Weaver (1948) et de Simpson (1949) qui permettent d'identifier si une espèce est dominante ou si toutes les espèces sont présentes avec un effectif similaire.

- Coefficients d'abondance-dominance et de sociabilité :

Le coefficient d'abondance-dominance, créé par Braun-Blanquet, désigne « une véritable *estimation de l'espace relative occupée. Il est déterminé à la fois par le nombre et la dimension des individus* ». Ce coefficient réunit les notions d'abondance et de dominance. L'abondance c'est « *le nombre d'individus qui forment la population de l'espèce présente dans le relevé* » tandis que la dominance « *représente le recouvrement de l'ensemble des individus d'une espèce donnée* » (Braun-Blanquet, 1951) (Figure 11).

La sociabilité des espèces révèle « le degré de dispersion spatiale des individus » : c'est le mode d'agrégation des individus. Elle est ajoutée au coefficient d'abondance-dominance, en la séparant de celle-ci par un point (Figure 12).

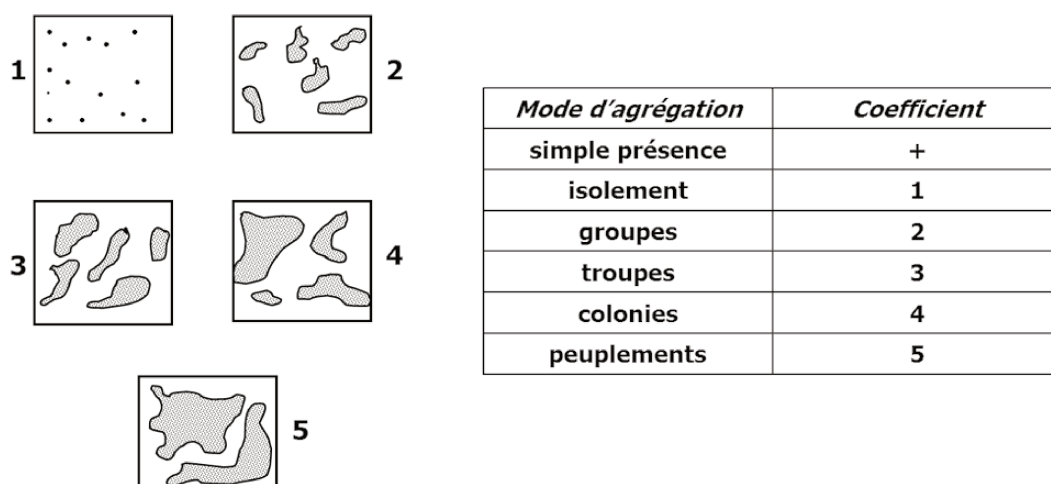


Figure 11 : Échelle des coefficients d'abondance-dominance de Braun-Blanquet (1951)

(+) *Peu d'individus, avec très faible recouvrement* ; (1) Recouvrement $< 1/20$, ou individus dispersés à couvert jusqu'à $1/20$ (5 %) ; (2) Recouvrement entre $1/20$ et $1/4$ (5–25 % de la surface de référence) ; (3) Recouvrement entre $1/4$ et $1/2$ (25–50 % de la surface de référence) ; (4) Recouvrement entre $1/2$ et $3/4$ (50–75 % de la surface de référence) ; (5) Nombre quelconque d'individus ou recouvrement $> 3/4$ de la surface de référence (> 75 %) (Walter, 2006).

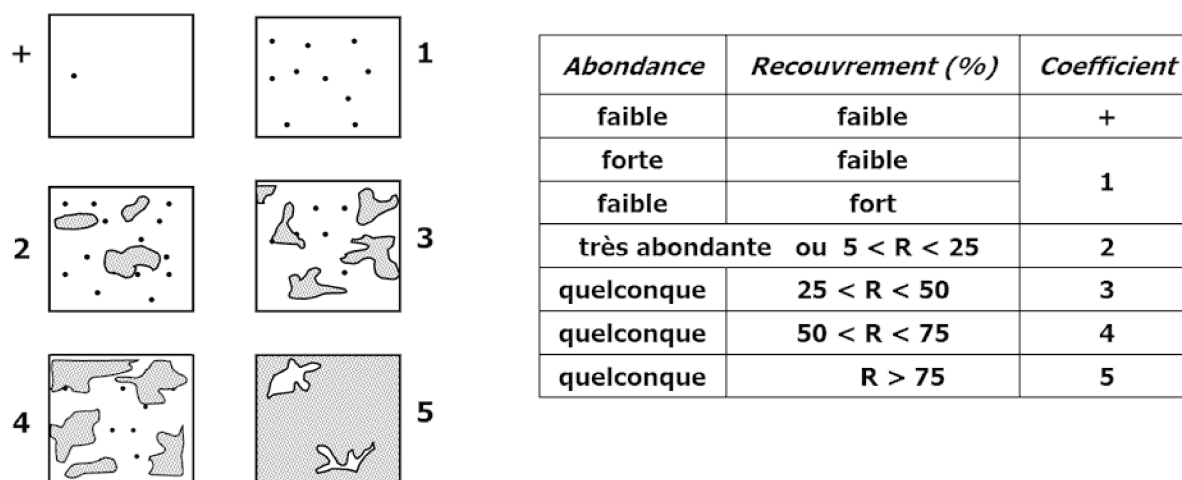


Figure 12 : Échelle des coefficients de sociabilité de Braun-Blanquet (1951)

(+) Simple présence ou présence faible ; (1) Croissance solitaire et isolée ; (2) Agrégats ou groupes denses ; (3) Population formant des petits groupes, ou des troupes ; (4) Petites colonies nombreuses ou formant un large tapis ; (5) Population presque pure, importante (Walter, 2006).

Le relevé floristique est effectué sur une fiche de relevé floristique en attribuant à la liste exhaustive des espèces leurs coefficients d'abondance-dominance et de sociabilité correspondants.

- Indices de diversité :

La diversité α ou intrahabitat est le nombre d'espèces présents dans un même habitat (Dajoz, 2008). En effet, une multitude d'indices est développée afin de mesurer cette diversité, dont :

- indice de Menhinick (d) tient compte du nombre d'espèces et d'individus dans un milieu donné. Il traduit la richesse spécifique du site. Il est calculé en utilisant la formule : $d = \frac{S}{\sqrt{N}}$, S étant le nombre d'espèces et N le nombre d'individus (Menhinick, 1964) ;
- indice de Margaleff (D_{mg}) mesure la richesse spécifique (Shalufa Assani et al., 2014). Il est calculé par : $D_{mg} = \frac{(S-1)}{\log_2 N}$ (Margalef, 1958) ;
- indice de Shannon Weaver (H'), aussi appelé indice de Shannon-Weaver ou Shannon-Wiener, ou simplement entropie est dérivé de la théorie de l'information (Marcon, 2015). Il est traduit par la formule : $H' = - \sum_{i=1}^S (p_i (\log_2 p_i))$ avec, $p_i = \frac{n_i}{N}$ (abondance relative de l'espèce) (Shannon, 1948 ; Shannon et Weaver, 1964) ;
- indice de Simpson ou de Gini-Simpson (D) est la probabilité de trouver deux individus tirés au hasard soient d'espèces différentes (Marcon, 2015). Il est calculé par : $D = 1 - (\sum_{i=1}^S p_i^2)$ (Simpson, 1949).

2.3.4.2. Détermination du taux de mycorhization des racines des plantes autochtones

Les racines des plantes inventoriées ont été colorées selon la technique de Phillips et Hayman (1970) (modifiée). Cette technique se déroule en plusieurs étapes :

- éclaircissement : les racines sont lavées et mises dans une solution de KOH 10 % à l'étuve à 70 °C pendant une heure ;
- acidification : quelques gouttes d'HCl 1 M sont ajoutées afin de rendre le milieu acide pendant 5 min ;
- coloration : les racines sont transférées dans le bleu de Trypan (500 mg de bleu de Trypan dans 330 mL acide lactique ($C_3H_6O_3$) + 330 mL glycérol ($C_3H_8O_3$) + 330 mL eau distillée) pendant 30 min à l'étuve à 70 °C ;
- décoloration : les racines sont conservées à long terme dans une solution de lacto-glycérol à 4 °C.

A noter qu'un rinçage des racines après chaque étape est indispensable.

Les racines les plus fines sont sélectionnées, coupées en fragments de 1 cm de longueur chacun. 15 fragments de racines fines sont montées entre lame et lamelle et examinées sous microscope optique afin de calculer le taux de mycorhization selon McGonigle et al. (1990) (Figure 13). Trois lectures sont faites pour chaque espèce végétale. Les structures fongiques observées à l'endroit de l'intersection de l'axe de l'objectif et le fragment racinaire ont été quantifiées.

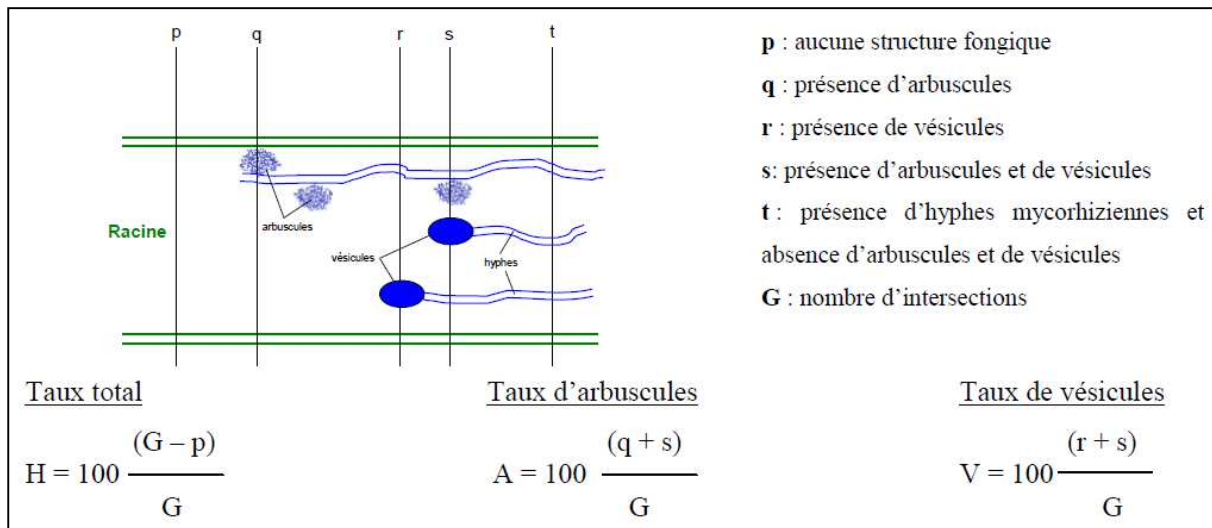


Figure 13 : Illustration des possibilités d'intersections pouvant exister entre un axe et une racine colonisée par un CMA (McGonigle et al., 1990)

2.4. Test de cytotoxicité

Afin d'étudier l'éventuelle toxicité du sol, deux lignées cellulaires humaines ont été exposées aux extraits organiques de notre sol pollué (chaque extrait a été obtenu à partir de 50 g de sol et 200 mL d'hexane) en réalisant une gamme de concentration croissante par multiple de 3 allant de 0,1 à 656,1 mg de sol pollué et en réalisant une cinétique d'intoxication de 24, 48 et 72 h. Les lignées cellulaires utilisées sont les Beas-2B (cellules épithéliales bronchiques) et les HepG2 (cellules hépatiques) dont la réplcation (doublement cellulaire) dure respectivement 24 et 30 h.

Le mode opératoire est exécuté selon Dergham et al. (2015). Les cellules conservées dans le DMSO à l'azote liquide sont décongelées puis mises en culture dans un milieu de culture approprié. Ce dernier est le RPMI pour les Beas-2B (auquel un fongizone et un antibiotique sont ajoutés) et le LHC9 pour les HepG2. Les cellules sont mises en culture dans des flacons Corning CellBind® pour Beas-2B et Corning pour HepG2, dans un incubateur HeraCell 150 (Kendro) (37 °C et 5 % CO₂), jusqu'à obtention du nombre de cellules souhaité.

Les cellules adhérentes sont décollées par l'action de la Trypsine (additionnée de Poly vinyl pyrrolidone (PVP) pour la lignée Beas-2B). Ensuite, du milieu de culture approprié est ajouté afin de limiter l'action de la trypsine, le mélange est centrifugé et le surnageant est éliminé. 10000 cellules sont transférées dans chaque puit d'une microplaque à 96 puits Corning CellBind® pour les Beas-2B et Corning pour les HepG2. 3 microplaques sont préparées pour chaque lignée cellulaire correspondant aux différents temps d'intoxication envisagés et sont laissées 24 h à l'incubateur. Le jour de l'intoxication, le nombre de cellules atteint 20000 cellules par puit. Le surnageant de chaque puit est remplacé par les différentes concentrations des extraits préparés dans du milieu de culture. 16 réplicats correspondent au témoin négatif dans lesquels du milieu de culture approprié aux lignées cellulaires est ajouté (milieu de culture sans polluant ; 100 % de viabilité) et 8 puits correspondent au témoin positif (100 % de mortalité) auxquels du Triton X-100 (2 % v/v) est ajouté.

Après 24, 48 et 72 h d'intoxication, la cytotoxicité des deux lignées cellulaires est évaluée à travers le dosage de deux activités enzymatiques : l'une indicatrice d'altération au niveau de la membrane plasmique des cellules (Lactate DésHydrogénase LDH) (Cytotoxicity Detection Kit LDH, Roche Diagnostics, Meylan, France) et l'autre révélatrice d'un dysfonctionnement de l'activité mitochondriale (DésMydrogénase mitochondriale DHm) (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics, Meylan, France), (Dergham et al., 2012).

2.5. Analyses statistiques

Toutes les extractions et les expériences ont été menées en triplicats. Afin de déterminer la différence significative des moyennes des taux de germination, le test ANCOVA test ($p < 0,05$) a été réalisé par le logiciel statistique XLSTAT. D'autre part, le test non-paramétrique Mann-Whitney U test (SPSS for Windows, v12.0.1, 2003 ; Paris, France) a été réalisé pour les tests de cytotoxicité.

3. Essai de phytoremédiation assistée par les CMA

3.1. Dispositif expérimental

L'efficacité de la phytoremédiation assistée par les CMA dans la remédiation du sol pollué de la Bekaa a été évaluée par la culture d'une plante aromatique productrice des HE, l'Origan (*Origanum syriacum*). L'expérience a été réalisée sur le terrain ainsi que dans des pots.

3.1.1. Expérimentation in situ

Quatre quadrats (Q3-Q4-Q7 et Q8) ont été cultivés par 9 plantules d'origan distantes de 30 cm les unes des autres (Figure 14).

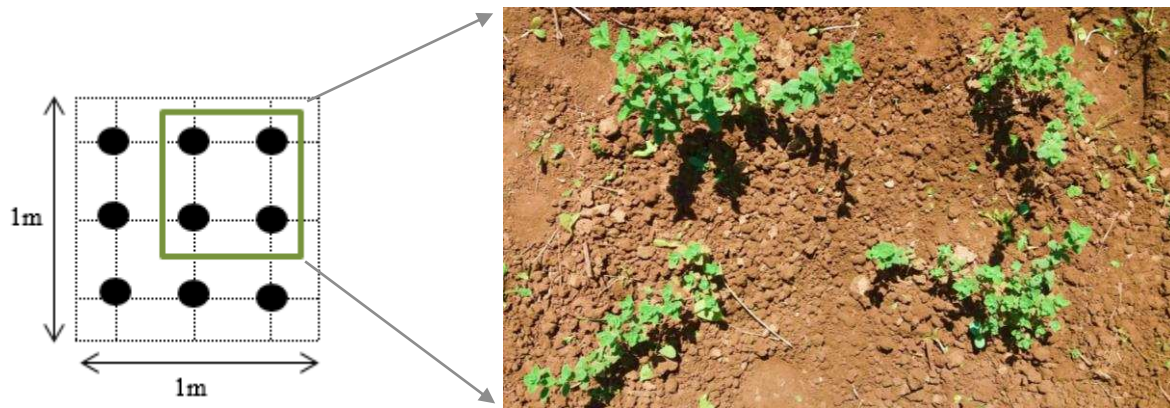


Figure 14 : *Schéma d'un quadrat végétalisé*

3.1.2. Expérimentation en microcosmes

Les conditions de phytoremédiation testées en pots (10 x 10 cm) sont les suivantes :

- sol stérilisé inoculé ;
- sol stérilisé non inoculé ;
- sol non stérilisé inoculé ;
- sol non stérilisé non inoculé.

Chaque pot est rempli de 500 g de sol (séché, broyé et tamisé à 2 mm) en présence de 30 g d'inoculum mycorhizien commercial Symbivit ®, composé de 6 espèces de CMA (*Claroideoglomus etunicatum*, *Glomus microaggregatum*, *Rhizophagus intraradices*, *Claroideoglomus claroideum*, *Funneliformis mosseae*, *Funneliformis geosporum*) pour les conditions inoculées, ou de son substrat équivalent pour les conditions non inoculées. Le sol utilisé est stérilisé ou non, par autoclavage (121 °C, 20 min, 1 bar). Chaque condition est répétée 10 fois en cultivant une plantule d'origan dans chaque pot. En parallèle, 3 pots non végétalisés sont laissés servant de témoin (Photographie 1).



Photographie 1 : Photographies montrant les conditions végétalisées (à gauche) et non végétalisées (à droite)

Après 4 mois de culture, les biomasses aériennes et racinaires obtenues ont été mesurées. Les biomasses aériennes sont destinées à l'extraction des HE. Les teneurs en alcanes dans le sol ainsi que leur transfert au niveau des HE ont été évalués. En outre, les taux de mycorhization des racines ont été évalués.

3.2. Extraction des alcanes

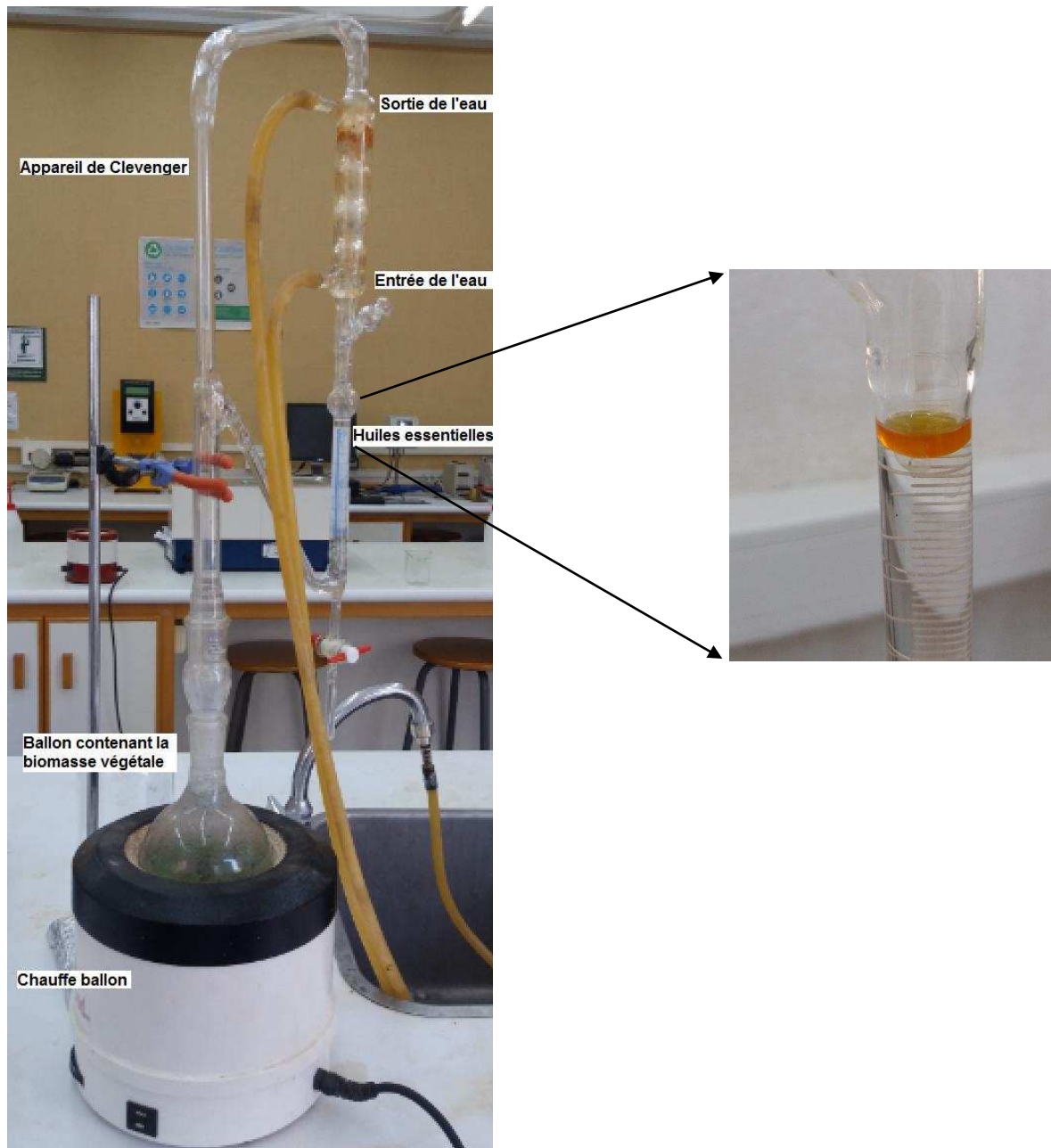
Les analyses des alcanes ont été réalisées selon la méthode décrite dans la partie 2.2.2. Les teneurs des alcanes avant phytoremédiation ont été comparés à ceux obtenus après la culture d'Origan dans le sol in situ. Ainsi, dans l'expérience en microcosme, les teneurs des alcanes des conditions végétalisées ont été comparés à ceux obtenus dans les conditions non végétalisées.

La dissipation des alcanes dans le sol a été calculée comme suit :

$$\text{Dissipation des alcanes (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{Concentration des alcanes dans le traitement}}{\text{Concentration des alcanes dans le témoin}} * 100 \right)$$

3.3. Extraction des HE

La totalité de la biomasse aérienne fraîche (feuilles et inflorescences) obtenue à partir chaque quadrat/expérience a été destinée à l'extraction des HE. Cette extraction est réalisée par le processus d'extraction conventionnel, l'hydrodistillation, à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Le processus consiste à chauffer la biomasse végétale dans un ballon de 500 mL pendant 3 h, en présence d'une quantité d'eau suffisante pour tremper la biomasse (Photographie 2).



Photographie 2 : Extraction des HE par hydrodistillation à l'aide de l'appareil de Clevenger

3.4. Analyse de la composition chimiques des HE et des alcanes

La composition chimique des HE extraites, les analyses des alcanes dans le sol ainsi que leur transfert potentiel dans les HE extraites ont été évaluée selon la méthode décrite par Zgheib et al. (2016).

3.4.1. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC)

Les différents échantillons ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse Thermo Electron Corporation, équipée d'une colonne capillaire HP-5MS (5 % Phenyl Methyl

Siloxane) (longueur 30 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur de la phase de 0,25 μm) et d'une colonne HP Innowax polyéthylène glycol (longueur 50 m, diamètre interne 0,2 mm, épaisseur de la phase 0,2 μm). Le volume d'injection est de 1 μL . Le débit du gaz vecteur, Hélium, est de 0,8 mL/min. Le programme débute à une température de 35 °C et augmente progressivement avec une vitesse de 5 °C /min pour atteindre 85 °C. Cette température est maintenue constante pendant 20 min, puis le gradient de température se poursuit avec une montée de 10 °C/min pour atteindre un palier de 300 °C pendant 5 min. Les échantillons ont été injectés en mode splitless à 250 °C. La détection à ionisation de flamme a été réalisée à 310 °C.

3.4.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

Les analyses chromatographiques en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ont été effectuées grâce à un chromatographe Agilent 6890 couplé à un détecteur de masse 5975. Le volume d'injection est de 1 μL . Les colonnes et le programme de température du four choisis pour les analyses GC/MS sont identiques à ceux utilisés pour les analyses GC. L'Hélium a été également utilisé comme gaz vecteur à un flux constant de 0,8 mL/min. Les spectres de masse ont été enregistrés à 70 eV et les températures des différentes parties du spectromètre ont été fixées à 310 °C pour la source d'ions et 320 °C pour la ligne de transfert. Les échantillons ont été injectés en mode splitless grâce à un échantillonneur automatique 7683 B. Les spectres de masse ont été enregistrés entre 50 et 400 uma.

L'identification et la quantification des composants des HE et des alcanes ont été effectuées en comparant les spectres de masse obtenus à l'issue des deux colonnes avec ceux stockés dans les bibliothèques NIST et Wiley 275 et la propre bibliothèque de l'USEK (Université Saint-Esprit de Kaslik) ou avec des spectres de masse de la littérature (Adams, 2007 ; Jennings, 1980).

Une identification supplémentaire a été réalisée par comparaison de leurs indices de rétention de Kovats à ceux de la littérature (Davies, 1990 ; Jennings, 1980) et à ceux des composés purs de référence obtenus de Sigma-Aldrich (Allemagne). Ces indices ont été déterminés par rapport à une série d'alcanes linéaires, « C8-C40 Alkanes Calibration Standard » contenant 35 alcanes (Supelco, Bellefonte, USA), séparée dans les mêmes conditions opératoires.

3.5. Taux de mycorhization

Les taux de mycorhization des racines d'origan ont été évalués après phytoremédiation selon la méthode décrite dans la partie 2.3.4.2.

3.6. Analyses statistiques

Toutes les extractions et les expériences ont été menées en triplicats. Afin de déterminer la différence significative des moyennes des biomasses racinaires et foliaires issus de la phytoremédiation, des taux de colonisation ainsi que les composants des HE, le test LSD de Fisher (Fisher's least significant difference (LSD)) ($p < 0,05$) a été effectué en utilisant le logiciel Statgraphics Centurion 15.2.11.0.

D'autre part, les différences significatives entre les concentrations des alcanes avant et après phytoremédiation in situ, ainsi qu'entre les résultats obtenus in situ et la condition non stérilisée et non inoculée en microcosme ont été étudiés selon le test de Student ($p < 0,05$) en utilisant le logiciel Statgraphics Centurion.

En outre, l'effet combiné de la stérilisation et de l'inoculation sur la composition chimique des HE a été étudié par le test d'analyse des composantes principales (ACP) en utilisant le logiciel SPSS 16.0.

4. Activités biologiques des HE

4.1. Matériels biologiques

Les HE testées ont été fournies par FERRANT PHE, producteur des HE (France) et extraites par hydrodistillation. Les HE analysées lors de cette étude sont extraites à partir de l'angélique (*Angelica archangelica*) (racines et graines), la ciboulette (*Allium schoenoprasum*), le cerfeuil (*Anthriscus cerefolium*), l'ail (*Allium tuberosum*), le poireau (*Allium porum*), l'oignon (*Allium cepa*), l'échalote (*Allium ascalonicum*) et le thuya (*Thuya atrovirens*). Tandis que, l'HE d'Origan (*Origanum syriacum*) a été fournie par le laboratoire de la Faculté des Sciences Agronomiques et Alimentaires, USEK-Liban.

4.2. Activité antifongique

Deux activités antifongiques des différentes HE contre le champignon phytopathogène *Fusarium culmorum* ont été testées, par contact direct et par volatilité.

4.2.1. Activité antifongique par contact direct

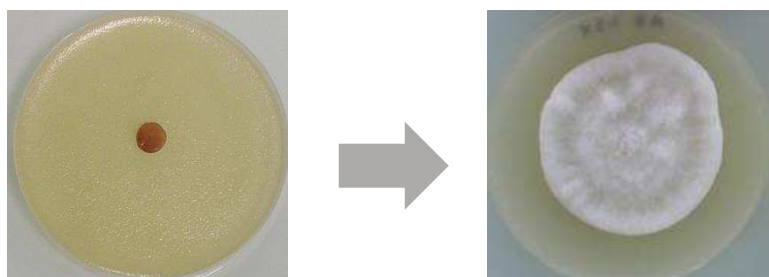
L'activité antifongique des HE par contact direct a été évaluée selon la méthode adaptée de Huang et al. (2010) et Quiroga et al. (2001). Le milieu de culture utilisé est le PDA (potato-dextrose agarose) à une concentration finale de 40 g.L⁻¹ et est stérilisé par autoclave à 120 °C pendant 20 min puis refroidis à 50 °C. Les HE stérilisées par filtration (0,2 µm) sont introduites dans le milieu de culture à 50 °C avant d'être coulé sous la hotte dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre. Les concentrations finales des HE varient entre 0,02 % et 2,5 % (diluées dans une solution éthanolique 1 %) dans un volume final de 25 mL de PDA par boîte. Des boîtes de Pétri contenant juste la solution éthanolique 1 % sont préparées servant comme témoin. Les boîtes sont par la suiteensemencées par des inocula de 9 mm de diamètre prélevés à l'aide d'un emporte-pièce à partir de la périphérie d'un tapis mycélien provenant d'une culture du champignon de 7 jours. Les inocula sont déposés renversés (mycélium en contact avec la gélose) au centre des boîtes. L'activité antifongique par contact direct est réalisée en absence et en présence des cyclodextrines HP-β-CD, oligosaccharides cycliques qui complexent les HE et augmentent leurs biodisponibilités, à une concentration finale de 10 mM dans le milieu de culture. Le diamètre de la croissance radiale du mycélium fongique est mesuré après 7 jours d'incubation à 20 °C. Chaque essai est répété trois fois. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est exprimé comme suivant :

$$\text{Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne} = \frac{X_0 - X_i}{X_0} \times 100$$

Où X_0 = le diamètre moyen de la croissance mycelienne du témoin ;

X_i = le diamètre moyen de la croissance mycelienne en présence des HE.

La concentration inhibitrice IC₅₀ nécessaire pour inhiber la croissance du mycélium de 50 % en comparaison avec le témoin est obtenue par interpolation graphique (Photographie 3).



Photographie 3 : Activité antifongique par contact direct

4.2.2. Activité antifongique par volatilité

L'activité antifongique des HE par volatilité a été évaluée selon la méthode adaptée de Abarca et al. (2016), en absence et en présence des cyclodextrines HP-β-CD (10 mM). Le

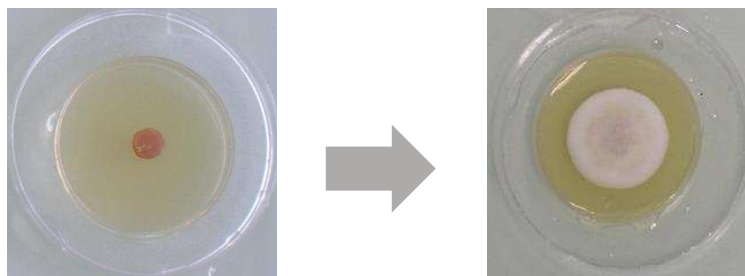
milieu de culture utilisé est le PDA (potato-dextrose agarose) à une concentration finale de 40 g.L⁻¹ et est stérilisé par autoclave à 120 °C pendant 20 min puis refroidis à 50 °C. 10 mL de PDA sont introduits dans une petite boîte de Pétri de 5,5 cm, qui est déposée au centre d'une grande boîte de 9 cm de diamètre contenant 10 mL de la solution des HE. Les concentrations finales en HE, stérilisées par filtration (0,2 µm), varient entre 0,01 % et 5 % et sont préparées dans une solution éthanolique 1 % ou dans une solution de HP-β-CD. Des boîtes de Pétri contenant juste la solution éthanolique 1 % ou bien HP-β-CD sont préparées servant comme témoin. Les boîtes sont par la suiteensemencées par des inocula de 9 mm de diamètre prélevés à l'aide d'un emporte-pièce à partir de la périphérie d'un tapis mycélien provenant d'une culture du champignon de 7 jours. Les inocula sont déposés renversés (mycélium en contact avec la gélose) au centre des boîtes. Le diamètre de la croissance radiale du mycélium fongique est mesuré après 5 jours d'incubation à 20 °C. Chaque essai est répété trois fois. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est exprimé comme suivant :

$$\text{Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne} = \frac{X_0 - X_i}{X_0} \times 100$$

Où X_0 = le diamètre moyen de la croissance mycélienne du témoin ;

X_i = le diamètre moyen de la croissance mycélienne en présence des HE.

La concentration inhibitrice IC₅₀ nécessaire pour inhiber la croissance du mycélium de 50 % en comparaison avec le témoin est obtenue par interpolation graphique (Photographie 4).



Photographie 4 : Activité antifongique par volatilité

4.3. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des HE a été évaluée en utilisant l'approche décrite par Brand-Williams et al., (1995) en utilisant le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH[•]). Des concentrations des HE (jusqu'à 25000 ppm) sont préparées dans l'éthanol. 0,2 mL de chaque concentration est dilué dans 2 mL d'eau pure ou de HP-β-CD (10 mM). 2 mL d'une solution éthanolique de DPPH[•] (0,1 mM) sont ajoutés au mélange. Les solutions ainsi obtenues sont agitées pendant 1 h à 25 °C et à l'obscurité. Chaque essai est répété trois fois.

L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 517 nm. L'activité antioxydante (AA%) est calculée selon la relation suivante :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100$$

Où A_i et A_0 sont les absorbances respectives obtenues pour l'échantillon testé et le témoin.

L'activité antioxydante ainsi obtenue est comparée à celle obtenue avec le standard Trolox®, analogue hydrophile de la vitamine E connu pour son pouvoir anti-radicalaire et les résultats sont exprimés par TEAC (Trolox® equivalent antioxidant capacity). La concentration inhibitrice IC50 est obtenue par interpolation graphique.

4.4. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des HE a été évaluée en utilisant la méthode de dénaturation de l'albumine selon Mizushima et Kobayashi (1968) et Sakat et al. (2010). Une gamme de volume des HE allant jusqu'à 150 μ L est ajoutée à 1 mL d'albumine bovine (0,2 %, pH = 6.8). Cette activité est réalisée en absence et en présence de HP- β -CD (10 mM) en ajoutant un volume d'eau ou de cyclodextrines équivalent au volume double des HE déposé au départ. Les échantillons sont incubés à 37 °C pendant 20 min puis à 72 °C pendant 20 min. Après refroidissement, une mesure spectrométrique à 660 nm a été réalisée. Chaque essai est répété 3 fois. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \left(1 - \frac{(A_i - A_x)}{A_0}\right) \times 100$$

où A_i et A_x correspondent aux absorbances relatives de l'échantillon testé et de son témoin positif : A_0 est l'absorbance du blanc.

La concentration inhibitrice IC50 est obtenue par interpolation graphique.

4.5. Analyses statistiques

Toutes les expériences sont réalisées en triplicats. Des tests statistiques ANCOVA ($p < 0,05$) sont effectuées en utilisant le logiciel XLSTAT 2014.5.03 afin de déterminer les différences significatives entre les moyennes des IC50 obtenues par les activités antifongiques (par contact direct et par volatilité), antioxydantes et anti-inflammatoires HE.

Résultats et Discussion

Présentation de la publication 1

Au Liban, le fleuve Litani est contaminé depuis des décennies par les eaux usées d'origines domestiques, hospitalières, agricoles et industrielles. Plusieurs études portant sur la qualité des eaux du Litani, ont révélé un niveau de pollution alarmant par plusieurs polluants organiques et inorganiques (Diab et al., 2014 ; Haydar et al., 2016 ; Kouzayha, 2013 ; Nehme et al., 2014a, 2014b). Les eaux du Litani sont largement utilisées pour irriguer les cultures, surtout pendant la saison sèche suite à la pénurie des ressources souterraines, provoquant ainsi un risque de contamination des sols et des cultures (Darwish et al., 2011, 2004). Ce transfert au sein de la chaîne alimentaire représente un risque majeur d'exposition de l'Homme à la pollution.

Ainsi, la présente étude consiste, dans un premier temps, en la caractérisation pédo-agronomique d'un sol prélevé d'une parcelle expérimentale (200 m²) située à Marj-Bekaa centrale, irriguée par les eaux contaminées du Litani. L'éventuelle présence des polluants inorganiques (ETM) et organiques (hydrocarbures aliphatiques et aromatiques polycycliques, dioxines et furanes et pesticides) dans ce sol a été recherchée. Ces contaminants pouvant entrer en contact avec l'Homme par différentes voies d'expositions telles que l'ingestion ou l'inhalation des envols de poussières, leur cytotoxicité a été estimée sur deux lignées cellulaires humaines : l'une d'origine hépatique (HepG2) et l'autre d'origine pulmonaire (Beas-2B) en mesurant deux activités enzymatiques indicatrices d'altérations au niveau de la membrane plasmique des cellules (Lactate DésHydrogénase, LDH) et de dysfonctionnement de l'activité mitochondriale (DésHydrogénase mitochondriale, DHm). Enfin, l'écotoxicité de ce sol a été évaluée grâce à (i) des tests de germination (blé, trèfle, luzerne, ray-grass, fétuque), (ii) la quantification de la biomasse tellurique via le dosage des marqueurs lipidiques spécifiques (PLFA), (iii) l'isolement et l'identification des CMA et (iv) l'établissement d'inventaire floristique sur le site.

Nos résultats montrent que la parcelle expérimentale choisie est contaminée par des ETM [Ni (88 mg.Kg⁻¹), Cr (122 mg.Kg⁻¹), V (170 mg.Kg⁻¹) et Mn (551 mg.Kg⁻¹)] et des alcanes (2541,1 mg.Kg⁻¹ du sol) dont les plus abondants sont l'hentriacontane, l'octadécane et l'hexadécane.

En revanche, aucune présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, de dioxines/furanes et de pesticides n'a été détectée. Les polluants présents dans ce sol (alcanes et ETM) seraient à l'origine de la cytotoxicité mise en évidence vis-à-vis des cellules épithéliales pulmonaires (BEAS-2B) et hépatiques (HEPG2). En effet, les deux lignées cellulaires humaines ont été exposées à un extrait organique de notre sol pollué en réalisant une gamme de quantités croissante par multiple de 3 allant de 0,1 à 656 mg et en réalisant une exposition de 24, 48 et 72 h. Les résultats révèlent une cytotoxicité importante sur les deux lignées cellulaires pour les plus fortes quantités (218 et 656 mg), avec une sensibilité plus prononcée pour la lignée pulmonaire (BEAS-2B).

D'autre part, ce sol présente également une écotoxicité importante. Les taux de germination des graines de blé, trèfle, luzerne, ray-grass et fétuque ont été réduits de 7 à 30 % sur le sol pollué par rapport à un sol témoin non pollué ou au terreau. Par ailleurs, une faible richesse de la microflore tellurique [bactéries Gram-positif et Gram-négatif, CMA et champignons saprotrophes et ectomycorhiziens] a été révélée grâce à la quantification des marqueurs lipidiques spécifiques. Les teneurs en bactéries Gram-positif (i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0) et Gram-négatif (cy17:0, C18:1 ω 7, cy19:0) sont de 3,53 et 2,24 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sol respectivement. Les teneurs en C18:2 ω 6,9, AGPL (acides gras associées aux phospholipides) marqueur de la biomasse des champignons saprotrophes et ectomycorhiziens est de 0,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sol, alors que les teneurs en C16:1 ω 5, PLFA marqueur de la biomasse des CMA est de 0,75 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sol. La densité des spores de CMA isolées du sol pollué de la Bekaa est de 316 spores/100 g du sol. Ces spores correspondent à 3 morphotypes de CMA identifiés : Funelliformis mosseae, Septoglomus constrictum et Claroideoglomus lamellosum. D'autre part, 16 espèces végétales ont été inventoriées sur le site, avec une prédominance de Silybum marianum L. En outre, toutes les plantes inventoriées étaient mycorhizées ce qui nous a incité à utiliser la phytoremédiation assistée par les CMA comme outil écologique de remédiation des sols.

Publication 1 : Ecotoxicity evaluation and human risk assessment of an agricultural polluted soil

Imad El-Alam^{1,2}, Anthony Verdin¹, Joël Fontaine¹, Frédéric Laruelle¹, Ramez Chahine², Hassane Makhlouf², Anissa Lounès-Hadj Sahraoui¹ *

1: Univ Littoral Côte d'Opale, EA 4492 – UCEIV – Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, SFR Condorcet FR CNRS 3417, F-62228 Calais cedex, France.

2: Equipe Stress Oxydatif et Antioxydants, Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, Université Libanaise, Campus Universitaire Hariri, Hadath, Liban.

*Corresponding author E-mail: lounes@univ-littoral.fr

Abstract:

The present study aims to evaluate the nature and level of chemical pollution as well as the potential toxicity and ecotoxicity of an agricultural soil irrigated by the water of Litani river. Our findings showed that the soil was mainly contaminated by alkanes (Hentriacontane, Octadecane, Hexadecane) and the metal trace element (Nickel, Vanadium, Chromium and Manganese). Soil organic extracts showed high cytotoxicity after in vitro exposure of both human hepatic (HepG2) and bronchial epithelial cells (Beas-2B), through evaluation of extracellular Lactate DeHydrogenase (LDH) and Mitochondrial DeHydrogenase (MDH) activities. For both cell lines, cytotoxicity was more pronounced considering the highest quantities of polluted soil (218.7 and 656.1 mg). Soil ecotoxicity was revealed by the seed germination test of 5 plant species (wheat, clover, alfalfa, tall fescue and ryegrass). Significant reductions by 7 up to 30 % were observed on the polluted soil compared to non-polluted one. In addition, the quantification of telluric microbial biomass exhibited a reduced rate of telluric microbiota in polluted soil. The amount of Gram negative and Gram positive bacteria were 3.53 and 2.24 $\mu\text{g.g}^{-1}$ of soil respectively. The PLFA C18:2 ω 6,9 (marker of saprotrophic and ectomycorrhizal fungal biomasses) was 0.5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ of soil while the PLFA C16:1 ω 5 (indicator of Arbuscular Mycorrhizal Fungi presence) was 0.75 $\mu\text{g.g}^{-1}$ of soil. The density of AMF spores isolated from the polluted soil was about 316 spores/100 g. The main AMF spores identified were *Funelliformis mosseae*, *Septoglomus constrictum*, *Claroideoglomus lamellosum*. Moreover, 16 indigenous plant species were inventoried with *Silybum marianum* L. as the dominant one. Biodiversity indices (Shannon, Simpson, Menhinick and Margaleff) were lower than those found in other contaminated soils. Finally, it was found that all the present plant species on this polluted site were mycorrhized, suggesting a possible protection of these plants against encountered pollutants, and the possibility to use phytotechnologies to decontaminate such site.

Key words:

Soil Pollution - Toxicity - Ecotoxicity - Biodiversity - Microbial Biomass

1. Introduction

Soil pollution is nowadays an important environmental issue worldwide. Irrigation using wastewater, irresponsible application of sewage sludge, industrial wastewater, pesticides and fertilizers, rapid urbanization, atmospheric deposition of aerosols and dust, vehicular emissions, etc. are known to be sources of soil contamination (Bou Kheir et al., 2010). These anthropogenic activities release organic and inorganic contaminants of emerging concern that are generally non-biodegradable and persistent, like metal trace elements, crude oil, aromatic hydrocarbons, dioxins and furans, Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), radionuclides, etc. Soil toxicity could disturb all biosphere's constituents and may present a serious risk to human health and its environment. Hazard and risk assessment of polluted sites are thus needed and are usually performed by chemical analysis. However, only chemical measurements may not be sufficient for biological risk assessment (Fernandez et al., 2005), that's why further toxicological and ecotoxicological tests are highly recommended to assess soil toxicity.

Human's exposure to xenobiotics from a contaminated site may occur through consuming polluted water, plants and animals, inhalation, skin contact, or, in children's case, by ingesting soil from fingers, toys and other objects. Toxicity risk of soil contaminants towards public health relies on their bioavailability after exposure, as well as aging and sorption processes (Alexander, 1995; Ruby et al., 1999; US EPA, 2004). Toxicity tests used to human risk assessment to soil contaminants are usually based on measurements of specific biomarkers. For example, measurements of tissue residues and biochemical responses of contaminants such as specific enzyme in blood like delta-aminolevulinic acid dehydrase concentrations for lead toxicity evaluation, acetylcholinesterase activity in brain tissue for neurotoxicity; in addition to genotoxicity (genetic abnormalities), physiological responses and histopathological abnormalities assessments (US EPA, 1989). Additionally, in vitro tests are widely used to assess contaminants cytotoxicity such as those concerning cell morphology (cell size and shape, nuclear size, cytoplasmic vacuolation), cell proliferation (increase in cell number, total DNA, RNA and protein), cell viability (vital dye uptake, fall in cell number), membrane damage [loss of enzymes (extracellular Lactate DeHydrogenase, LDH), loss of ions and cofactors (Ca^{2+} , K^+ , NADPH)], uptake or incorporation of radioactive precursors (Uridine and RNA synthesis, Thymidine and DNA synthesis, amino acids and protein synthesis), metabolic effects (inhibition of metabolic cooperation) (Baderna et al.

2011; Baderna et al. 2013; Knox et al. 1986; Kumbıçak et al. 2014; National Health and Medical Research Council 1999).

Besides the soil toxicity assessment, the US Environmental Protection Agency suggests a battery of tests available to assess soil ecotoxicity that combine both ecological and toxicological impacts of chemical pollutants on populations, communities, and ecosystems and also the fate (transport, transformation, and breakdown) of these pollutants in the environment (Forbes and Forbes, 1994). Amongst these tests, there are for example earthworm survival assay, lettuce (*Latuca sativa*) seed germination, root elongation assays, and also microbial toxicity tests like ATP-TOX test (An, 2004; Greene et al., 1989; Kumpiene et al., 2014; Kwak et al., 2014; US EPA, 1989). Furthermore, in their review, Stephenson et al. (2002) suggested toxicity tests used for ecotoxicological evaluation of contaminated sites. These tests are based on the use of species from different taxonomic groups including earthworms, nematodes, microarthropods, collembolan, isopods and plants.

In this context, several studies and reviews evaluated the toxicity and ecotoxicity of contaminated soils. Indeed, soil pollutants such as crude oil and metal trace elements present toxic effect on seed germination (Adam and Duncan, 2002; Gong, 2001; Hawley, 1985), on worm survival (Chaîneau et al., 2003) and on soil microbial enzymatic activities and diversity (Alrumman et al., 2015; Andreoni et al., 2004; Giller et al., 2009; Kirk et al., 2005; Thavamani et al., 2012). Besides, the toxicity of soil contaminants on human health was also assessed (Broadway et al., 2010; Chou et al., 2002; Luo et al., 2012; Olawoyin et al., 2012; Taylor et al., 2010). However, limited are the studies that evaluate agricultural soil toxicity using in vitro cell culture.

Thus, the current study aims to evaluate the nature and level of chemical pollution (organic and inorganic contaminants) and the potential toxicity and ecotoxicity of a soil sampled in the Bekaa valley and directly irrigated by the water of Litani river where numerous organic and inorganic pollutants have been detected (chlorinated organic substances, fecal coliform, salmonella, and other microbiological parameters, metal trace elements, pesticides) (El-Fadel et al. 2003; Nehme et al. 2014; USAID 2011a, 2011b). Human risk assessment of the polluted soil was evaluated by two enzyme activities, extracellular Lactate DeHydrogenase (LDH, indicating the alteration of cell membrane permeability) and Mitochondrial DeHydrogenase (MDH, indicating the alteration of mitochondrial activity), by using in vitro human hepatic and bronchial epithelial cell cultures. Besides, soil ecotoxicity was assessed through seed germination tests of several plant species

(wheat, clover, alfalfa, tall fescue, and ryegrass), quantification of telluric microbial biomass (Gram-positive and Gram-negative bacterial, arbuscular mycorrhizal, saprotrophic and ectomycorrhizal fungal biomasses) using specific lipid biomarkers, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) isolation and identification and plant biodiversity.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental site

The Litani River is the largest perennial river in Lebanon. Litani's water is used for irrigation of agricultural soils in Bekaa valley: fruit trees (apple, pear, cherry, peach), vineyards and olive trees, winter cereals (wheat, barley, lentils, fava beans and chickpeas); and summer vegetables (tomatoes, cabbage, onion, etc.), corn, tobacco and potato (both early in the spring and later in the autumn). Human activities located principally in the Upper Basin of Litani, contaminate the watercourse with several waste sources (domestic, industrial, medical and also agricultural wastewater) through illegal activities of water users. These contaminants reduce the quality of water in the Litani river basin (Diab et al. 2014; Kouzayha 2013; Nehme et al. 2014). However, the farmers of the region still use Litani River's water for irrigation due to limited water resources, especially in the dry season. The experimental site is located in the Upper Litani Basin, in Marj village (Latitude: 33.766404, Longitude: 35.876819). It measures 200 m² and is usually cultivated by cereals (wheat, barley), potatoes and beetroot. 9 quadrats of 1 m² are delimited as showed in Figure 1 and used for sampling. The soil samples used for further analyses were taken from the first horizon of soil from 0 to 25 cm of depth.

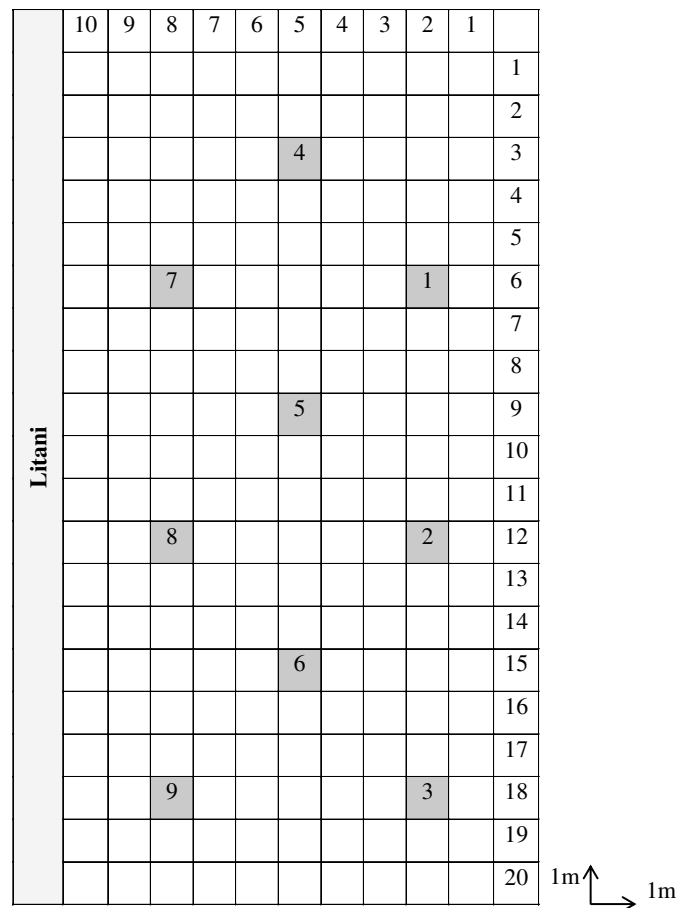


Figure 1: Delimited quadrats in experimental site

2.2. Physico-chemical characterization

Soil texture and physico-chemical characterization were analyzed by the National Institute of Agronomic Research (www.inra.fr, Arras, France) according to standardized French procedures (AFNOR) (AFNOR, 1999) or International procedures (ISO) (ISO, 1999). The soil samples were air-dried and sieved at 2 mm prior to being used for analyses. Soil texture as evaluated according to NF X 31107 (AFNOR, 1999) where soil samples were partitioned into five particle size fractions: 0–2, 2–20, 20–50, 50–200, 200–2000 μm . Soil pH was measured in deionized water (1:5 soil/solution ratio) (ISO 10390). Organic carbon and total nitrogen were determined according to ISO 10694 and ISO 13878 procedures respectively. Total limestone and phosphorus contents were assessed with respect to ISO 10693 and ISO 11263 procedures respectively. Exchangeable cations contents in soil were analyzed by ICP-AES/EAF (NF ISO 23470) (Ciesielski and Sterckeman, 1997; Orsini and Remy, 1976).

2.3. Pollutant analysis

All soil samples were sieved to 2 mm and lyophilized during 48 hours prior pollutant analysis.

- **Metal Trace Elements:** total soil digestion was carried out with a mixture of hydrofluoric (HF) and perchloric (HClO₄) acids according to NF X 31-147 using 0.25 g of soil. Total concentrations of Al, Ba, Cr, Cu, Na, Ni, Fe, V, Zn, K, As, Co, Mg, Mn were measured by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) while total concentrations of Pb, Cd, Tl, Mo were measured by inductively coupled argon plasma mass spectrometry (ICP-MS) (AFNOR, 1999).
- **Aliphatic Hydrocarbons and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs):** total Aliphatic Hydrocarbons (alkanes) were extracted according to Rahman method followed with minor modifications (20 ml of hexane to 5 g of soil, extraction time: 1 hour) (Rahman et al., 2003), while total PAHs were extracted in a Soxhlet apparatus according to Verdin method (modified) [(120 ml of dichloromethane to 10 g soil, 70 °C, ambient pressure, the flow rate of 60 min/cycle for 16 hours)] (Verdin et al., 2006). Identification and quantification of both alkanes and PAHs in soil were performed as described by Lenoir et al. (2016b) using Zebron column ZB-5MS (5% phenyl-arylene; 95% methylpolysiloxane) [length (10 m), diameter (0.10 mm) and phase thickness (0.1 µm)] from Phenomenex for the separation of hydrocarbons.
- **Dioxins and Furans:** 17 congeners of Dioxins (PCDD) and Furans (PCDF) were analyzed by referring to EPA (The United States Environmental Protection Agency) method (EPA, 2007). The extraction was performed with 10 g of soil using Accelerated Solvent Extraction (ASE) (50 °C, 103 bars). Analysis and identification of these pollutants were performed by GC/HRMS. Individual toxicity of PCDD/Fs toward human well-being was assessed using human/mammalian toxic equivalency factor (TEQ) as suggested by the World Health Organization (WHO) (Van den Berg et al., 2006).
- **Pesticides:** one hundred eleven congeners of pesticides were analyzed by Micropollutants Technologie SA, Metz. Extraction, identification and quantification of these congeners were performed by GC-MS-MS/GC-MSD with respect to XP X33-012 standards.

2.4. Soil toxicity

The soil toxicity was assessed by using organic (200 ml of hexane to 50 g of soil, extraction time: 1 hour) as aqueous (200 ml of water to 50 g of soil, extraction time: 1 hour) extracts from the polluted soil. After evaporation, the extracts were resuspended in DMSO; 1 % (v,v) (final concentration in culture medium) on in vitro cultures of both human hepatic cells (HepG2) and bronchial epithelial cells (Beas-2B), through evaluation of extracellular Lactate DeHydrogenase (LDH) and Mitochondrial DeHydrogenase (MDH) activities (Dergham et al., 2015). Extracts quantities tested were ranging from 0.1 to 656.1 mg of polluted soil during 24, 48 and 72 hours of exposure.

BEAS-2B cells were cultured in CellBIND® surface plastic flasks (Corning; ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) containing LHC9 medium (Fisher Scientific, Illkirch, France), while HepG2 were cultured in cell-treated surface plastic flasks (Corning; ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) containing RPMI medium (supplemented with antibiotic and fungizone, 1 % v/v) (Fisher Scientific, Illkirch, France). Cell lines were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂. Culture supernatants were removed to eliminate nonadherent cells. Nonexposed cells were used as controls (i.e., 100 % viability) and Triton X-100 (1 %, v/v)-exposed cells as positive controls (i.e., 100 % mortality). Accordingly, 16 replicates were chosen as control cells (without pollutants), 8 replicates/concentration as exposed cells, and 8 replicates as positive controls (i.e., Triton X-100, 1 % v/v). After 24, 48, or 72 hours of exposure, the cytotoxicity in Beas-2B and HepG2 cells was evaluated by studying extracellular Lactate DeHydrogenase (LDH) activity in cell-free culture supernatants (Cytotoxicity Detection Kit LDH, Roche Diagnostics, Meylan, France) and Mitochondrial DeHydrogenase (MDH) activity in cells (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics, Meylan, France), as previously published by Dergham et al. (2012).

2.5. Soil ecotoxicity

Soil ecotoxicity was evaluated by:

- **Seed germination:** thirty seeds of wheat (*Triticum aestivum* L. var. orventis), clover (*Trifolium pratense* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.), and ryegrass (*Lolium perenne* L.) were sown in 30 g of polluted, non-polluted and potting soils soil. The polluted soil was obtained from the experimental site whereas the non-polluted one was a non-irrigated soil by Litani River. 3 replicates were done per

condition. The experiment was performed in an artificial climate chamber of 25 °C under dark condition. The germination rate was measured after 2, 4, 7 and 10 days, as follow:

$$\text{Germination rate} = \frac{\text{number of germinated seed} \times 100}{\text{total number of seeds}}.$$

- Quantification of microbial biomass:** after removing plant debris from soil samples, 3 replicates of 3 g of freeze-dried soil (from each soil sample) were analyzed to measure the fatty acid content. Lipid extraction was performed according to Frostegård et al. (1991) and Labidi et al. (2015). The extracted lipids were fractionated into neutral lipids, glycolipids and polar lipids on a silica acid column by successively eluting with chloroform, acetone and methanol (1:2:1, v:v:v). The methanol fraction (containing the phospholipids) was subjected to a trans-esterification using a base solution (KOH 0.2 M) prepared in methanol to transform the PLFA. Final extracts were analyzed by GC-MS with the use of a SHIMADZU 2010 Plus system gas chromatograph (GC) equipped with an automatic injector AOC-20i and coupled to a mass spectrometry SHIMADZU QP 2010 Ultra. The separation of fatty acids was executed with Zebron Phenomenex ZB-Wax capillary column (length 10 m, diameter 0.1 mm, phase thickness 0.1 mm). The GC instrument operated with the following conditions: injection volume of 0.5 µl in Split mode (ratio 200) and High purity Helium (99.99%) was used as a carrier gas (37 cm.s⁻¹); while the MS instrument operated with electronic impact at 70 eV and temperatures of 250 °C for ion source and 280 °C for the transfer line in both SCAN and SIM modes. The ion fragments monitored were 250-256-268-270-284-294-296-310-312. The temperature program included a fast rise from 175 °C to 275 °C at 25 °C min⁻¹. Fatty acid quantification was made by using nonadecanoic acid methyl ester (C19:0) as an internal standard. Their identification relied on the retention times of fatty acids standard « Bacterial Acide Methyl Ester CP Mix in methyl coproate– SUPELCO (10 mg/mL) » and its mass analysis. The system was operated in the constant linear velocity (70 cm.s⁻¹) using helium as a carrier gas. Fatty acids were identified by comparing their mass spectra with the standard mass spectra in the NIST11s library. The amounts of the phospholipid fatty acids (PLFA) C16:1ω5 are used as indicators of the AMF biomass, while PLFA C18:2ω6,9 for saprotrophic and ectomycorrhizal fungi biomass. Gram-positive bacteria biomasses were estimated by the quantification of the PLFA: i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0 amounts and Gram-negative bacteria biomass by the quantification of the PLFA: cy17:0, C18:1ω7 and cy19:0 amounts in the soil.
- Isolation and identification of arbuscular mycorrhizal fungi spores:** AMF spores were isolated from 100 g of air-dried soil according to the wet sieving method described by

Gerdemann and Nicolson (1963). Detailed isolation and identification procedures are given by Bencherif et al. (2015).

- **Plant biodiversity:** floristic inventory of the 9 quadrats delimited in the experimental site left fallow for one year and spontaneously colonized by plant species, was realized based on the manual of Mousterde (1983, 1970, 1966) and confirmed by Pr. Hassane Makhoul, the botanist of the Department of Life and Earth Sciences – Lebanese University. A cover-abundance value was allocated to each identified species according to Braun-Blanquet (1951). Several biodiversity indices were used to calculate plant diversity: Shannon index that gives the distribution of species abundance and also reveals rare species (Shannon, 1948; Shannon and Weaver, 1964), Simpson index that measures the heterogeneity (the probability that two individuals selected at random from a sample will belong to the same species) (Simpson, 1949), and Menhinick and Margaleff indices that measure species richness (Margalef, 1958; Menhinick, 1964).
- **Determination of root mycorrhizal colonization:** in order to determine arbuscular mycorrhizal colonization of inventoried plant species, the roots were colored by Trypan blue as described in Phillips and Hayman (1970). Roots fragments were examined with microscopic observations (x40) to detect the presence of AMF structures: arbuscules, vesicles and intraradical hyphae.

2.6. Statistical analysis

All extractions and experiments were performed in triplicates. In order to determine the significant difference between the means of seed germination rate test, ANCOVA test ($p < 0.05$) was done using XLSTAT. Furthermore, the non-parametric Mann-Whitney U test (SPSS for Windows, v12.0.1, 2003; Paris, France) was performed for cytotoxicity tests.

3. Results

3.1. Physicochemical characterization

Table 1 summarizes the physicochemical characteristics of the soil sampled in Marj-Village. The particle size distribution showed that the soil had high clay content (665 g.Kg^{-1} of soil). The soil was moderately alkaline ($\text{pH}=8.4$) with moderate high organic matter content (25 g.Kg^{-1}) while total limestone and phosphorus contents were 195 g.Kg^{-1} and 0.03

g.Kg⁻¹ respectively. The analysis of exchangeable cation contents showed that calcium ion was the most abundant (45 cmol⁺/Kg).

Table 1: Physico-chemical characterization of the soil

Component	Concentration
Clay	665 g.Kg ⁻¹
Silt	308 g.Kg ⁻¹
Sand	48 g.Kg ⁻¹
pH	8.37
Organic Carbon (C)	14.27 g.Kg ⁻¹
Total Nitrogen (N)	1.28 g.Kg ⁻¹
C/N	11.1
Organic matter	24.6 g.Kg ⁻¹
Limestone (CaCO ₃)	195 g.Kg ⁻¹
Phosphorus (P ₂ O ₅)	0.031 g.Kg ⁻¹
Aluminum (Al)	0.135 cmol ⁺ /Kg
Manganese (Mn)	<0.005 cmol ⁺ /Kg
Iron (Fe)	0.033 cmol ⁺ /Kg
Potassium (K)	0.808 cmol ⁺ /Kg
Sodium (Na)	0.702 cmol ⁺ /Kg
Magnesium (Mg)	7.27 cmol ⁺ /Kg
Calcium (Ca)	45.3 cmol ⁺ /Kg

Values are means of triplicate.

3.2. Pollutant analysis

- **Metal Trace Elements:** table 2 shows Al, Ba, Cr, Cu, Na, Ni, Fe, Pb, V, Zn, Cd, K, As, Co, Mg, Mn, Mo and Tl contents in the soil of the sampling site. Mo (1.2 mg.Kg⁻¹) and Cd (0.5 mg.Kg⁻¹) had the lowest concentrations whereas As was not detected in the soil.

Table 2: Concentrations of Metal Trace Elements in the soil

Metal Trace Element	Concentration (mg.Kg⁻¹)	Threshold limits according to the Canadian soil quality guidelines (CCME 2007) (mg.Kg⁻¹)
Al	80666.7 ± 2411.1	
Fe	59433.3 ± 1563.1	
Mg	9420 ± 134.5	
K	7270 ± 186	
Na	675 ± 59	
Mn	551 ± 12	470
V	170 ± 32	130
Ba	155 ± 35	
Zn	127 ± 1.5	200
Cr	122 ± 6	64
Ni	88.7 ± 1.6	50
Cu	30.9 ± 0.6	63
Co	26.6 ± 0.6	40
Pb	21 ± 1.7	70
Mo	1.15 ± 0.03	5
Cd	0.473 ± 0.009	1.4
Tl	0.453 ± 0.004	
As	nd*	

Values are depicted as mean ± standard deviation. *nd: not detected.

- **Aliphatic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons:** alkane's concentration was estimated at 2541.1 mg.Kg⁻¹ of the soil. Major alkanes were: hentriacontane, octadecane and hexadecane with concentrations about 431.9, 355.8 and 0.279.5 mg.Kg⁻¹ of soil respectively (Figure 2). Otherwise, the 16 PAHs listed as priority pollutants by the US-EPA were not detected in Bekaa soil (data not shown).

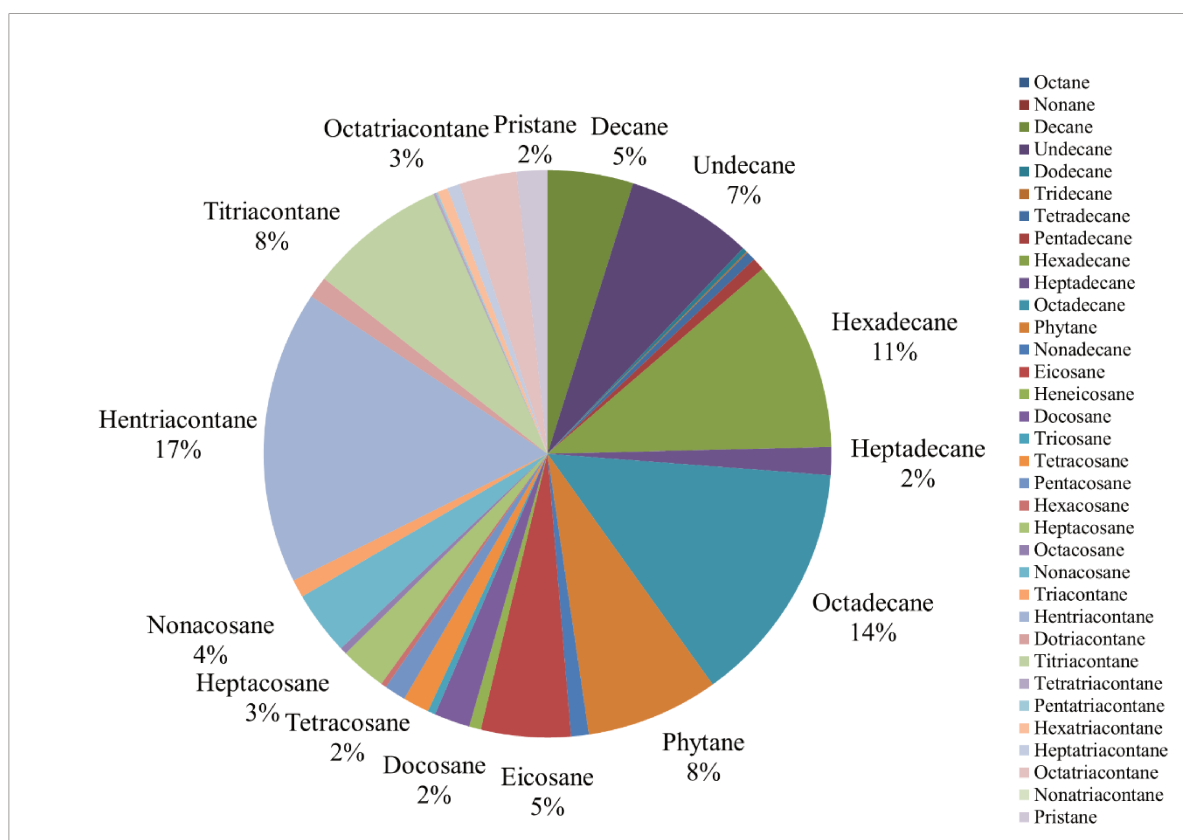


Figure 2: Alkane contents in the soil

- **Dioxins and Furans:** table 3 shows that the concentration of 12378-PeCDD congener is 3.24 ng TEQ.Kg⁻¹ of soil. The other 16 PCDD/PCDF congeners were lower than the limit of quantification.

Table 3: Concentrations of Dioxins and Furans in Bekaa soil

Congeners		Toxicity Equivalence Factor (TEF)	Concentrations (ng.Kg ⁻¹)
Furans	2378-TCDF	0.1	<1.05
	12378-PeCDF	0.03	<1.57
	23478-PeCDF	0.3	<1.57
	123478-HxCDF	0.1	<2.09
	123678-HxCDF	0.1	<2.09
	234678-HxCDF	0.1	<2.09
	123789-HxCDF	0.1	<2.09
	1234678-HpCDF	0.01	<3.14
	1234789-HpCDF	0.01	<3.14
	OCDF	0.003	<10.5
Dioxins	2378-TCDD	1	<1.05
	12378-PeCDD	1	3.24
	123478-HxCDD	0.1	<2.09
	123678-HxCDD	0.1	<2.09
	123789-HxCDD	0.1	<2.09
	1234678-HpCDD	0.01	<3.14
	OCDD	0.03	<10.5
Total concentration			<6.53

- **Pesticides:** concentrations of the main pesticides (DDT, Azinphos-ethyl, Azinphos-methyl, Captan, Chlordane-cis, Chlordane-trans, Chlorpyrifos-ethyl, Chlorpyrifos-methyl, Ethoprophos, Isodrine, Malathion, Parathion, etc.) used in agriculture in the Bekaa valley were lower than the limit of quantification (Table 4).

Table 4: Main pesticides analyzed in Bekaa soil

Congeners	Concentration (mg.kg⁻¹ of soil)	Congeners	Concentration (mg.kg⁻¹ of soil)
1245-tetrachlorobenzene	<0.005	Fenpropimorphe	<0.005
124-trichlorobenzene	<0.005	Fensulfothion	<0.005
24-DDD	<0.005	Fenthion	<0.005
24-DDE	<0.005	Folpel	<0.027
24-DDT	<0.005	HCH-alpha	<0.005
44-DDD	<0.005	HCH-beta	<0.005
44-DDE	<0.005	HCH-delta	<0.005
44-DDT	<0.005	HCH-gamma	<0.005
Acephate	<0.133	Heptachlor	<0.005
Acetochlor	<0.005	Heptachlore-endo-epoxide	<0.005
Aclonifen	<0.005	Heptachlor-exo-epoxide	<0.005
Alachlor	<0.005	Hexabromobiphenyl	<0.005
Aldrine	<0.005	Hexachlorobenzene	<0.005
Anthraquinone	<0.005	Iodofenfos	<0.005
Atrazine	<0.005	Isodrine	<0.005
Azinphos-ethyl	<0.005	Kresoxim-methyl	<0.005
Azinphos-methyl	<0.005	Lenacil	<0.005
Beflubutamide	<0.005	Malathion	<0.005
Bifenthrine	<0.005	Mecarbam	<0.005
Bitertanol	<0.005	Metamitron	<0.005
Bromopropylate	<0.005	Metazachlor	<0.005
Captan	<0.027	Methidathion	<0.005
Carbophenothion	<0.027	Methoxychlor	<0.005
Chlordane-cis	<0.005	Metolachlor	<0.005
Chlordane-trans	<0.005	Metribuzin	<0.005
Chlorfenvinphos	<0.005	Mirex	<0.005
Chlorothalonil	<0.027	Oxadiazon	<0.005
Chlorpropham	<0.005	Oxadixyl	<0.005
Chlorpyrifos-ethyl	<0.005	Oxychlordane	<0.005
Chlorpyrifos-methyl	<0.005	Parathion	<0.027
Chlortal-dimethyl	<0.005	Parathion-methyl	<0.005
Cyfluthrine	<0.027	Pendimethaline	<0.005
Cyhalotrin-lambda	<0.005	Pentachloroanisole	<0.005
Cypermethrine	<0.133	Pentachlorobenzene	<0.005
Cyprodinil	<0.005	Perthane (pp-ethyl-DDD)	<0.005
DEF	<0.005	Procymidone	<0.005
Deltamethrine	<0.027	Profenofos	<0.005
Diazinon	<0.005	Prometryn	<0.005
Dichlobenil	<0.005	Propazine	<0.005

3.3. Soil Toxicity

Figure 3 shows the MDH and LDH activities after BEAS-2B and HepG2 cell exposure to increasing quantities (from 0.1 mg to 656.1 mg) of polluted soil extracts after 24 hours of exposure. Extracellular LDH and MDH activities in cell free culture supernatants were respectively significantly enhanced and decreased versus non-exposed cells. Indeed, soil organic extracts induced a high toxicity on both cell lines for highest quantities (218.7 and 656.1 mg of polluted soil). Thus, both LDH and MDH activities were gradually increased and decreased respectively from lowest quantities (0.1 mg) of polluted soil for the bronchial cell line, contrary to hepatic cell lines for which only highest quantities present cytotoxicity. The same cytotoxicity effect was obtained for all exposure times (24, 48, and 72 hours) for the two cell lines, as well as for the aqueous soil extracts (data not shown).

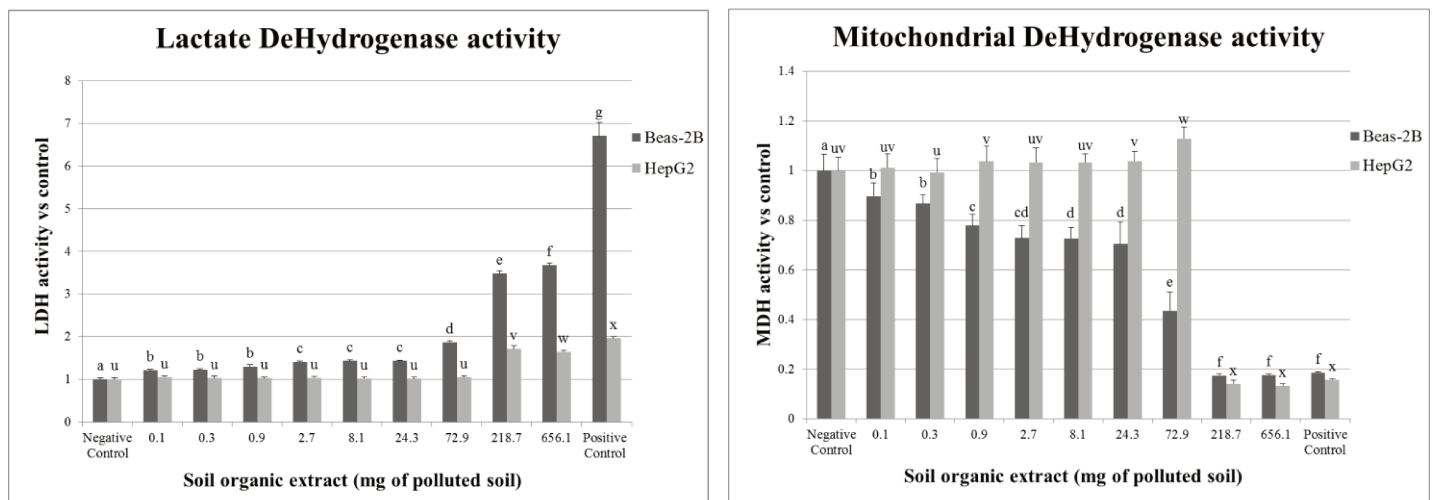


Figure 3: LDH and MDH activities after 24 hours of organic soil extracts exposure on both bronchial and hepatic human cells lines.

Values are depicted as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate significant differences between results obtained for Beas-2B and HepG2 cell lines at $p < 0.05$ as determined by Mann-Whitney U test.

3.4. Soil Ecotoxicity

- **Seed germination:** figure 4 shows the germination rates of several seed cultures (wheat, clover, ryegrass, alfalfa, and tall fescue) sown on Bekaa polluted soil, and both non-polluted and potting soils serving as a control. Seed germination differs among seedlings and is affected by the nature of the substrate: seed germination rate of wheat reached 97 % on potting soil, 84 % on non-polluted soil and 68 % on polluted soil, while seed germination rate of tall fescue reached 74 % on potting soil and 67 % on both non-polluted

and polluted soils. In general, the germination rate is reduced from 7 to 30 % on the polluted soil in comparison with non-polluted and potting soils for all seedlings. However, significant reductions were obtained only for wheat and ryegrass on the polluted soil in comparison with potting and non-polluted soils.

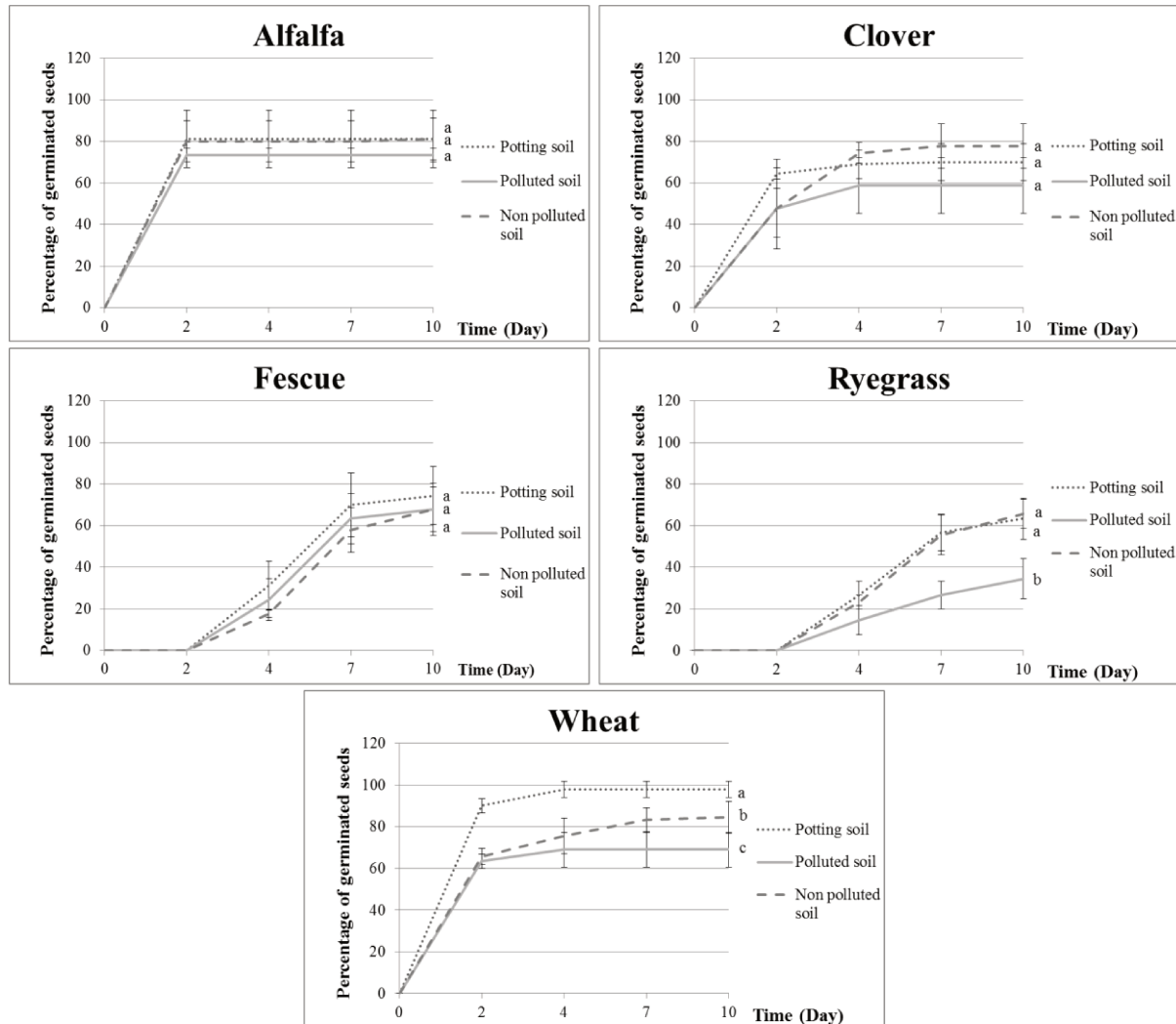


Figure 4: Seed germination rates

- Quantification of microbial biomass:** figure 5 summarizes the microbial biomass through the quantification of specific lipid biomarkers PLFA. The results showed that the sampled soil is richer in Gram negative biomass (estimated by the sum of the PLFA: cy17:0, C18:1 ω 7 and cy19:0) than Gram positive bacteria (quantified by the sum of the PLFA: i15:0, a15:0, i16:0, i17:0 and a17:0) ($3.53 \mu\text{g.g}^{-1}$ of soil and $2.24 \mu\text{g.g}^{-1}$ of soil respectively). The amount of AMF biomass (estimated by the PLFA C16:1 ω 5) was $0.75 \mu\text{g.g}^{-1}$ of soil while the content of saprotrophic and ectomycorrhizal fungal biomasses were about $0.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ of soil (estimated by PLFA C18:2 ω 6,9).

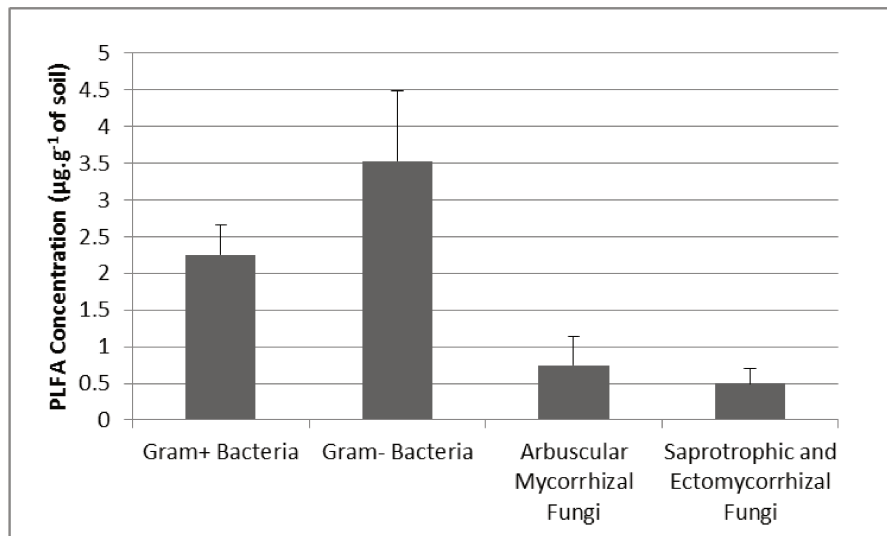


Figure 5: Quantification of microbial biomass in Bekaa soil

- **Isolation and identification of AMF spores:** in total, 316 AMF spores were isolated from 100 g of Bekaa soil. Three AMF species were identified according to their morphology: *Funelliformis mosseae*, *Septoglomus constrictum*, *Claroideoglomus lamellosum*. *F. mosseae* is the most abundant species (301 spores/100 g soil) (data not shown).
- **Plant biodiversity:** detailed floristic inventory, inventoried species' families and biodiversity indices for the whole study area are presented in Table 5, 6 and 7 respectively. Bekaa site was spontaneously colonized by 16 plant species belonging to 10 families. Compositae is the abundant plant family and *Silybum marianum* L. is the dominant species. This biodiversity differs slightly among the 1 m² delimited quadrats. Vegetation recovery ranged from 80 to 100 %. Biodiversity indices were about 1.36 and 0.68 for Shannon and Weaver index and Simpson index respectively; species richness was about 0.75 and 1.17 with respect to Menhinick and Margaleff indices respectively. On the other hand, indigenous plant species were found to be mycorrhized: AMF structures (arbuscules, vesicles and intraradical hyphae) were observed inside root fragments examined.

Table 5: Phytosociological table of Bekaa experimental site

Quadrat	1	2	3	4	5	6	7	8	9
High (cm)	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Recovery (%)	100	80	97	100	95	99	100	98	100
Surface (m²)	1 m ²								
List of plant species	Cover-abundance value								
Ammi majus L.	.	.	.	+	.	+	1.2	.	.
Anthemis chia L.	.	.	.	.	.	.	+	.	.
Capsella bursa-pastoris (L.) Medik.	.	.	.	.	.	.	.	.	1.2
Cichorium intybus L.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
Cousinia hermonis Boiss.	.	+	.	.	.	1.1	.	3.3	.
Ecballium elaterium (L.) A.Rich.	1.1	.	.	.	.	.	.	.	.
Fumaria asepalae Boiss.	.	.	.	.	.	.	.	1.1	.
Galium aparine L.	4.4	.	1.1	1.1	.	.	2.2	.	1.2
Lamium amplexicaule L.	.	.	+	.	.	+	+	.	+
Phalaris brachystachys Link.	.	1.2	1.2	1.1	2.2	+	1.2	1.2	2.3
Ranunculus cornutus D.C	.	.	.	.	.	.	.	+	.
Ridolfia segetum (L.) Moris.	.	1.2	.	1.2	3.3	.	.	.	.
Silybum marianum L.	+	3.3	4.5	4.5	1.2	4.5	1.2	1.2	4.4
Sinapis arvensis L.	2.3	1.1	+	.	2.2	1.1	.	1.1	2.2
Torilis radiata Moench.	2.2	+	.	.	.	.	.	.	1.2
Trifolium sp.	.	.	.	+	.	.	.	.	.

Cover-abundance values are estimated for all inventoried plant species in the delimited quadrats by using the Braun-Blanquet cover-abundance scale. Two scales are used separated by a period. The first indicates the number of species and the proportion of the area covered by that species, ranging from “+” (sparse and covering a small area) to “5” (covering more than 75% of the area). The second scale indicates how the species are grouped and ranges from “1” (growing singly) to “5” (growing in pure populations). “.” indicates the absence of the correspondent species.

Table 6: Inventoried species' families

Apiaceae	Ammi majus L. Ridolfia segetum (L.) Morris Torilis radiata Moench
Brassicaceae	Capsella bursa-pastoris (L.) Medik Sinapis arvensis L.
Compositeae	Anthemis chia L. Cichorium intybus L. Cousinia hermonis Boiss. Silybum marianum L.
Cucurbitaceae	Ecballium elaterium (L.) A.Rich.
Fabaceae	Trifolium sp.
Lamiaceae	Lamium amplexicaule L.
Papaveraceae	Fumaria asepalia Boiss.
Poaceae	Phalaris brachystachys Link
Ranunculaceae	Ranunculus cornutus D.C.
Rubiaceae	Galium aparine L.

Table 7: Biodiversity indices

Biodiversity Indices	Value
Shannon & Weaver index	1.36 ± 0.19
Simpson index	0.68 ± 0.06
Menhinick index	0.75 ± 0.17
Margaleff index	1.17 ± 0.26

Values are depicted as mean ± standard deviation of biodiversity indices of 9 quadrats.

4. Discussion

The present study aims to evaluate the nature and level of chemical pollution as well as the potential toxicity and ecotoxicity of an agricultural soil irrigated by Litani's water. Firstly, the presence of pollutants in the soil sampled in Marj village (Bekaa, Lebanon) was investigated. A mixture of 32 alkanes was detected at a concentration of 2541.1 mg.Kg⁻¹ soil, which is 5 times higher than the French soil quality guidelines (500 mg.Kg⁻¹) (INERIS, 2012). In addition, metal trace element analysis showed an important contamination with Nickel (89 mg.Kg⁻¹), Chromium (122 mg.Kg⁻¹), Vanadium (170 mg.Kg⁻¹) and Manganese (551 mg.Kg⁻¹) according to the Canadian soil quality guidelines (CCME, 2007). The contamination may originate from industrial effluents (metal process, leather or paper product industries, motor vehicle repair) that are directly discharged in Litani's watershed without any kind of treatment (El-Fadel et al., 2003; USAID, 2012a). However, the analyses of 17 congeners of dioxins and furans and the 16 polycyclic aromatic hydrocarbons listed by the US-EPA showed that the soil was not contaminated by these pollutants. Furthermore, the concentrations of the main pesticides used by farmers in the Bekaa valley such as Azinphos-ethyl, Azinphos-methyl, Captan, Chlordane-cis, Chlordane-trans, Chlorpyrifos-ethyl, Chlorpyrifos-methyl, Ethoprophos, Isodrine, Malathion and Parathion, were found to be lower than the limit of quantification.

The alarming concentrations of several pollutants (alkanes and metal trace elements) may affect soil microbial biomasses. Indeed, the quantification of specific PLFA pointed out poorer amounts of telluric bacteria and fungal biomasses in Bekaa soil compared to non-contaminated soils described in the literature. Indeed, the amounts of specific PLFA in non-contaminated soils ranged between 2.4-11 µg.g⁻¹ for Gram positive bacteria, 3.5-3.8 µg.g⁻¹ for Gram negative bacteria, 0.5-1700 µg.g⁻¹ for AMF and 0.01-3.3 µg.g⁻¹ for saprotrophic and ectomycorrhizal fungi respectively (Driai, 2016; Frostegård et al., 1993; Zelles and Bai, 1993).

Moreover, the sampled soil was richer considering bacterial and fungal biomasses compared to other metal trace element polluted soil (Driai, 2016). In comparison to artificially polluted arable soil with Cd, Cu, Ni, Pb, or Zn, Bekaa soil contained higher bacterial and fungal biomasses except for Gram positive biomass (Frostegård et al., 1993). Contrary, the results obtained in the current study showed higher microbial biomass than those found in Scots pine forest-Sweden (both non-contaminated and artificially polluted soil

with trace elements) (Frostegård et al., 1993), but poorer than those obtained in Finland for the same forest type (Bååth et al., 1992).

This difference of microbial biomasses in Bekaa soil and other contaminated and non-contaminated sites could be referred to physicochemical characteristics of concerned soils, and also to the sensitivity of the native bacterial community to pollution. Indeed, Bekaa soil texture is estimated to be clay according to soil textural triangle (USDA, 1999). The soil pH (8.37) is slightly more alkaline than usual ones and the concentration of organic matter is 3-fold richer than other agricultural soils in Bekaa (Darwish et al., 2011). The content of total limestone is 2.5-fold higher with respect to a former fluvial terrace (Chalhoub et al., 2009). Thus, the concentrations of nitrogen and phosphorus are 2 and 5-fold lower than in non-agricultural and unpolluted soil respectively (Bhogal et al., 2009; Karthik et al., 2014).

Additionally, AMF spores richness in Bekaa soil was also assessed. The results showed that the number of AMF spores isolated from Bekaa soil was about 316 spores/100 g. The AMF spores densities vary usually from 297 to 1400 spores/100 g in non-polluted soils (Oehl et al., 2004; Yang et al., 2015). Based on their morphological characters, 3 AMF morphotypes (*Funelliformis mosseae*, *Septoglomus constrictum*, *Claroideoglossum lamellosum*) have been identified while AMF diversities found in non-disturbed soils can reach up to 43 and 52 AMF taxa in grassland and forests respectively (Zangaro et al., 2013). In Bekaa soil, *F. mosseae* was the most abundant AMF species. It was proved that *F. mosseae* is able to tolerate different environmental conditions such as crude oil, petroleum or metal trace element contaminated soils (Cabello, 1997; Hassan et al., 2011; Huang et al., 2007). This AMF species is an early stage colonizer that can tolerate soil disturbances by the production of many offspring, and evolving adapted strategy to survive in such disturbed environments (Sýkorová et al., 2007).

In addition, we found that high concentration of pollutants in our soil have affected seed germination rates of several cultures (wheat, clover, ryegrass, alfalfa, and tall fescue) which were reduced by 7 up to 30 % on the polluted soil in comparison with non-polluted soil, in particular for wheat and ryegrass. This may be due to the phytotoxicity of Bekaa soil and to different sensitivities of the tested seeds toward soil pollution. Besides, soil pollutants could affect the integrity and hardness of the seed coat and lead to contaminants penetration into the seed. This may generate injury to seed embryo tissues (Adam and Duncan, 2002) and in consequence, reduces the growth activity of the embryo maybe by disturbing of the mechanisms of the enzymes function, or by troubling the transporting canals implicated in the

germination physiology. Further tests should be conducted to determinate the exact causes of disturbing seed germination on a polluted soil.

On the other hand, Bekaa spontaneous vegetation biodiversity study revealed the presence of 16 plant species belonging to 10 families. *Silybum marianum* L., frequently found in Mediterranean regions, was the dominant plant species. Its seed extract, silymarin, is known to have antioxidant properties on the glycemic profile in diabetic patients as well as antihepatotoxic and hepatoprotective activities (Dvořák et al., 2003; Huseini et al., 2006; Sánchez-Sampedro et al., 2005).. In addition, indices of diversity (Shannon–Wiener and Simpson) and richness (Margalef and Menhinick) were lower than those reported in grasslands (Deng et al., 2016; Hernández and Pastor, 2008; Motamedi and Sourì, 2016). Furthermore, diversity indices showed that Bekaa soil is lower in plant biodiversity in comparison with other contaminated soil. Richness indices values were below data described in a metal trace and a crude oil contaminated soils (Hernández and Pastor, 2008; Xiong et al., 1997). Moreover, inventoried indigenous plant species were found to be mycorrhized by AMF (results not shown). AMF structures (arbuscules, vesicles and intraradical hyphae) were observed inside root fragments examined (results not shown), which demonstrated the capacity of indigenous AMF spores to colonize plant roots. This symbiotic association plays an important role in plant protection against abiotic stress such as pollution (Smith and Read, 2008). This protection is revealed by implementing various mechanisms such as morphological adaptation (i.e. avoidance strategy), production of molecules able to protect cells against damages (antioxidants, chaperone proteins and trehalose), pollutant transport, compartmentalization, and transformation as well as transcriptional gene expression changes in both AMF and host roots cells (expression of several genes encoding proteins such as metal trace elements transporters, metallothioneins, 90 kD heat shock protein and glutathione S-transferase) (Hildebrandt et al. 2007; Lenoir , et al. 2016b; Ouziad et al. 2005).

The Bekaa soil toxicity was also evaluated through two complementary tests indicators of cytotoxicity. While extracellular LDH activity and intracellular MDH activity were respectively gradually increased and decreased in BEAS-2B cell culture, from the lowest quantities of polluted soil extracts (0.1 mg) to achieve a huge cytotoxic effect at the highest concentrations (218.7 and 656.1 mg), only these two highest concentrations were found to be cytotoxic against HepG2 cells. This could be due to a more efficient metabolism system in hepatic cells (Ambolet-Camoit et al., 2015; Petriello et al., 2016), contrary to bronchial epithelial cells which seemed to be more sensitive to pollutant exposure. These results showed that, depending on the concentration, the Bekaa soil extracts induced a cell death on

both cell lines through a plasma membrane disruption and a mitochondrial functioning alteration. Thus, exposure to such contaminated soil may represent a serious risk to public health especially for the farmers who are directly exposed to soil particles during agricultural activities. Soil particles could be ingested through oral or respiratory routes, and also through dermal contact. Indeed, these pollutants may be absorbed by human intestine or skin and cause liver granulomas, histiocytosis in the mesenteric or other lymph nodes, and dermal toxicity (Albro and Fishbein, 1970; Barrowman et al., 1989; Chou et al., 2002; Nash et al., 1996). That's why, dermatotoxicity assessment of Bekaa's soil organic extracts could be of interest (Chou et al., 2002).

5. Conclusion

In conclusion, this study showed that the texture of the soil directly irrigated by the Litani's water is mainly contaminated by alkanes and metal trace elements. These pollutants may be the cause of the toxicity through human cell lines and the ecotoxicity through seed germination rate, microbial biomass and plant biodiversity. However, in spite of the presence of pollutants, some plants are able to grow and some AMF are able to survive and to colonize the plant roots. That is why, we propose to test in the future, AMF-assisted phytoremediation to clean-up this soil. The efficacy of such phytotechnology will be evaluated by assessing the residual concentrations of the pollutants and by measuring the cytotoxicity towards human cell lines and ecotoxicity towards seed germination and quantification of microbial specific lipid biomarkers before and after phytoremediation.

Acknowledgements

The authors wish to thank the “Association de Spécialisation et d’Orientation Scientifique” for providing financial supports for Mr I. El-Alam. We are grateful to Natacha Bourdon, Benoit Tisserant and Charbel Ghossein for their technical support.

References

- Adam, G., Duncan, H., 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ. Pollut.* 120, 363–370. doi:10.1016/S0269-7491(02)00119-7
- Albro, P.W., Fishbein, L., 1970. Absorption of aliphatic hydrocarbons by rats. *Biochim. Biophys. Acta* 219, 437–446. doi:10.1007/SpringerReference_211540
- Alexander, M., 1995. How toxic are toxic chemicals in soil? *Environ. Sci. Technol.* 29, 2713–2717. doi:10.1021/es00011a003
- Ambolet-Camoit, A., Ottolenghi, C., Leblanc, A., Kim, M.J., Letourneur, F., Jacques, S., Cagnard, N., Guguen-Guillouzo, C., Barouki, R., Aggerbeck, M., 2015. Two persistent organic pollutants which act through different xenosensors (alpha-endosulfan and 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin) interact in a mixture and downregulate multiple genes involved in human hepatocyte lipid and glucose metabolism. *Biochimie* 116, 79–91. doi:10.1016/j.biochi.2015.07.003
- An, Y.J., 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environ. Pollut.* 127, 21–26. doi:10.1016/S0269-7491(03)00263-X
- Bååth, E., Frostegård, Å., Fritze, H., 1992. Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 4026–4031.
- Baderna, D., Colombo, A., Amodei, G., Cantù, S., Teoldi, F., Cambria, F., Rotella, G., Natolino, F., Lodi, M., Benfenati, E., 2013. Chemical-based risk assessment and in vitro models of human health effects induced by organic pollutants in soils from the Olona valley. *Sci. Total Environ.* 463–464, 790–801. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.06.088
- Baderna, D., Maggioni, S., Boriani, E., Gemma, S., Molteni, M., Lombardo, A., Colombo, A., Bordonali, S., Rotella, G., Lodi, M., Benfenati, E., 2011. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill’s leachate: Chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. *Environ. Res.* 111, 603–613. doi:10.1016/j.envres.2011.01.015
- Barrowman, J.A., Rahman, A., Lindstrom, M.B., Borgstrom, B., 1989. Intestinal absorption and metabolism of Hydrocarbons. *Prog. Lipid Res.* 28, 189–203. doi:10.1016/0163-7827(89)90012-X
- Bencherif, K., Boutekrabt, A., Fontaine, J., Laruelle, F., Dalpé, Y., Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2015. Impact of soil salinity on arbuscular mycorrhizal fungi biodiversity and microflora biomass associated with *Tamarix articulata* Vahl rhizosphere in arid and semi-arid Algerian areas. *Sci. Total Environ.* 533, 488–494. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.07.007
- Bhogal, A., Nicholson, F.A., Chambers, B.J., 2009. Organic carbon additions: Effects on soil bio-physical and physico-chemical properties. *Eur. J. Soil Sci.* 60, 276–286.

- doi:10.1111/j.1365-2389.2008.01105.x
- Bou Kheir, R., Greve, M.H., Abdallah, C., Dalgaard, T., 2010. Spatial soil zinc content distribution from terrain parameters: A GIS-based decision-tree model in Lebanon. *Environ. Pollut.* 158, 520–528. doi:10.1016/j.envpol.2009.08.009
- Braun-Blanquet, J., 1951. *Pflanzensoziologie. Grundzüge der Veg.* Springer, Wien.
- Cabello, M.N., 1997. Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiol. Ecol.* 22, 233–236. doi:10.1111/j.1574-6941.1997.tb00375.x
- CCME, Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health, 2007.
- Chalhoub, M., Vachier, P., Coquet, Y., Darwish, T., Dever, L., Mroueh, M., 2009. Caractérisation des propriétés hydrodynamiques d'un sol de la Bekaa (Liban) sur les rives du fleuve Litani. *Etude Gest. des Sols* 16, 67–84.
- Chou, C.-C., Riviere, J.E., Monteiro-Riviere, N.A., 2002. Differential relationship between the carbon chain length of jet fuel aliphatic hydrocarbons and their ability to induce cytotoxicity vs. interleukin-8 release in human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Sci.* 69, 226–233. doi:10.1093/toxsci/69.1.226
- Ciesielski, H., Sterckeman, T., 1997. A comparison between three methods for the determination of cation exchange capacity and exchangeable cations in soils. *Agronomie* 17, 9–15.
- Darwish, T., Atallah, T., Francis, R., Saab, C., Jomaa, I., Shaaban, A., Sakka, H., Zdruli, P., 2011. Observations on soil and groundwater contamination with nitrate: A case study from Lebanon-East Mediterranean. *Agric. Water Manag.* 99, 74–84. doi:10.1016/j.agwat.2011.07.016
- Deng, L., Wang, K., Li, J., Zhao, G., Shangguan, Z., 2016. Effect of soil moisture and atmospheric humidity on both plant productivity and diversity of native grasslands across the Loess Plateau, China. *Ecol. Eng.* 94, 525–531. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.06.048
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 2012. Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM_{2.5-0.3}) produced in rural, urban, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Chem. Res. Toxicol.* 25, 904–919. doi:10.1021/tx200529v
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Cazier, F., Billet, S., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 2015. Temporal-spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution Particulate Matter (PM_{2.5-0.3}) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Environ. Res.* 137, 256–267. doi:10.1016/j.envres.2014.12.015
- Driai, S., 2016. Impact des polluants d'origine industrielle sur le développement des champignons mycorhiziens à arbuscules, sur leur diversité et sur la viabilité microbienne des sols des agro-écosystèmes du Nord-est algérien. Université BADJI MOKHTAR-ANNABA.
- Dvořák, Z., Kosina, P., Walterová, D., Šimánek, V., Bachleda, P., Ulrichová, J., 2003. Primary cultures of human hepatocytes as a tool in cytotoxicity studies: cell protection against model toxins by flavonolignans obtained from *Silybum marianum*. *Toxicol. Lett.*

- 137, 201–212. doi:10.1016/S0378-4274(02)00406-X
- El-Fadel, M., Maroun, R., Bsar, R., Makki, M., Reiss, P., Rothberg, D., 2003. Water Quality Assessment of the Upper Litani River Basin and The Lake Qaraoun Lebanon.
- Fernandez, M.D., Cagigal, E., Vega, M., Urzelai, A., Babin, M., Pro, J., Tarazona, J.V., 2005. Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62, 174–184. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.11.013
- Forbes, V.E., Forbes, T.L., 1994. *Ecotoxicology in Theory and Practice*, illustrate. ed. Chapman & Hall Ecotoxicology, London.
- Frostegård, A., Tunlid, A., Bååth, E., 1993. Phospholipid Fatty Acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3605–3617.
- Frostegård, Å., Tunlid, A., Bååth, E., 1991. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *J. Microbiol. Methods* 14, 151–163. doi:10.1016/0167-7012(91)90018-L
- Gerdemann, J.W., Nicolson, T.H., 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46, 235–244. doi:10.1016/S0007-1536(63)80079-0
- Greene, J.C., Bartels, C.L., Warren-Hicks, W.J. Parkhurst, B.R., Linder, G.L., Peterson, S.A., Miller, W.E., 1989. *Protocols for Short-Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites.*, EPA/600/3-88/029. Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR (USA).
- Hassan, S.E.-D., Boon, E., St-Arnaud, M., Hijri, M., 2011. Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils. *Mol. Ecol.* 20, 3469–3483. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05142.x
- Hernández, A.J., Pastor, J., 2008. Relationship between plant biodiversity and heavy metal bioavailability in grasslands overlying an abandoned mine. *Environ. Geochem. Health* 30, 127–133. doi:10.1007/s10653-008-9150-4
- Hildebrandt, U., Regvar, M., Bothe, H., 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68, 139–146. doi:10.1016/j.phytochem.2006.09.023
- Huang, J., Tang, M., Niu, Z., Zhang, R., 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi in petroleum-contaminated soil in Suining area of Sichuan Province. *Chinese J. Ecol.* 9 14.
- Huseini, H.F., Larijani, B., Heshmat, R., Fakhrzadeh, H., Radjabipour, B., Toliati, T., Raza, M., 2006. The efficacy of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Phyther. Res.* 20, 1036–1039. doi:10.1002/ptr.1988
- INERIS, 2012. Réutilisation des terres excavées sur des projets d'aménagement : élaboration des seuils vis-à-vis des risques sanitaires.
- ISO, 1999. *Soil Quality. Guidance on the ecotoxicological characterisation of soils and soil materials.* Guidelines no ISO TC 190/ SC 7 ISO/DIS 15799. ISO, Geneva, Switzerland.
- Karthik, D., Vijayarekha, K., Manickam, V., 2014. Land Characterizations Based on Soil Properties Using Clustering Techniques. *World Appl. Sci. J.* 29, 60–64. doi:10.5829/idosi.wasj.2014.29.dmsct.11
- Knox, P., Uphill, P.F., Fry, J.R., Benford, J., Balls, M., 1986. The frame multicentre project on *In vitro* cytotoxicology. *Food Chem. Toxicol.* 24, 457–463. doi:10.1016/0278-

6915(86)90092-X

- Kumbıçak, Ü., Çavaş, T., Çinkılıç, N., Kumbıçak, Z., Vatan, Ö., Yılmaz, D., 2014. Evaluation of in vitro cytotoxicity and genotoxicity of copper-zinc alloy nanoparticles in human lung epithelial cells. *Food Chem. Toxicol.* 73, 105–112. doi:10.1016/j.fct.2014.07.040
- Kumpiene, J., Bert, V., Dimitriou, I., Eriksson, J., Friesl-Hanl, W., Galazka, R., Herzig, R., Janssen, J., Kidd, P., Mench, M., Müller, I., Neu, S., Oustriere, N., Puschenreiter, M., Renella, G., Roumier, P.-H., Siebielec, G., Vangronsveld, J., Manier, N., 2014. Selecting chemical and ecotoxicological test batteries for risk assessment of trace element-contaminated soils (phyto)managed by gentle remediation options (GRO). *Sci. Total Environ.* 496, 510–522. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.130
- Kwak, J. Il, Kim, S.W., An, Y.-J., 2014. A new and sensitive method for measuring in vivo and in vitro cytotoxicity in earthworm coelomocytes by flow cytometry. *Environ. Res.* 134, 118–126. doi:10.1016/j.envres.2014.07.014
- Labidi, S., Fontaine, J., Laruelle, F., Tisserant, B., Dalpé, Y., Grandmougin-Ferjani, A., Douay, F., Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2015. Fly ash-aided phytostabilisation of highly trace element polluted topsoils improves the telluric fungal biomass: A long-term field experiment. *Appl. Soil Ecol.* 85, 69–75. doi:10.1016/j.apsoil.2014.09.006
- Lenoir, I., Fontaine, J., Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2016a. 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., 2016b. 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
- Margalef, R., 1958. Information theory in ecology. *Gen. Syst.* 3, 36–71.
- Menhinick, E.F., 1964. A comparison of some species-individuals diversity indices applied to samples of field insects. *Ecology* 45, 859–861. doi:10.2307/1934933
- Motamedi, J., Souri, M., 2016. Efficiency of numerical and parametrical indices to determine biodiversity in mountain rangelands. *Acta Ecol. Sin.* 36, 108–112. doi:10.1016/j.chnaes.2016.02.001
- Mouterde, P., 1983. *Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie. Tome III.* Editions de l’Imprimerie catholique.
- Mouterde, P., 1970. *Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie. Tome II.* Editions de l’Imprimerie catholique.
- Mouterde, P., 1966. *Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie. Tome I.* Editions de l’Imprimerie catholique.
- Nash, J.F., Gettings, S.D., Diembeck, W., Chudowski, M., Kraus, A.L., 1996. A toxicological review of topical exposure to white mineral oils. *Food Chem. Toxicol.* 34, 213–225. doi:10.1016/0278-6915(95)00106-9
- National Health and Medical Research Council, N., 1999. Toxicity assessment for carcinogenic soil contaminants.
- Nehme, N., Haydar, C., Koubaissy, B., Fakih, M., Awad, S., Toufaily, J., Villieras, F., Hamieh, T., 2014. The Distribution of Heavy Metals in the Lower River Basin, Lebanon.

- Phys. Procedia 55, 456–463. doi:10.1016/j.phpro.2014.07.066
- Oehl, F., Sieverding, E., Mäder, P., Dubois, D., Ineichen, K., Boller, T., Wiemken, A., 2004. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138, 574–583. doi:10.1007/s00442-003-1458-2
- Orsini, L., Remy, J.C., 1976. Utilisation du chlorure de cobaltihexammine pour la détermination simultanée de la capacité d'échange et des bases échangeables des sols. *Sci. Sol* 4, 269–275.
- Ouziad, F., Hildebrandt, U., Schmelzer, E., Bothe, H., 2005. Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* 162, 634–649. doi:10.1016/j.jplph.2004.09.014
- Petriello, M.C., Hoffman, J.B., Sunkara, M., Wahlang, B., Perkins, J.T., Morris, A.J., Hennig, B., 2016. Dioxin-like pollutants increase hepatic flavin containing monooxygenase (FMO3) expression to promote synthesis of the pro-atherogenic nutrient biomarker trimethylamine N-oxide from dietary precursors. *J. Nutr. Biochem.* 33, 145–153. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.03.016
- Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 158–160. doi:10.1016/S0007-1536(70)80110-3
- Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., Banat, I.M., 2003. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour. Technol.* 90, 159–168. doi:10.1016/S0960-8524(03)00114-7
- Ruby, M. V., Schoof, R., Brattin, W., Goldade, M., Post, G., Harnois, M., Mosby, D.E., Casteel, W., Berti, W., Carpenter, M., Edwards, D., Cragin, D., Chappell, W.R., 1999. Advances in evaluation the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3697–3705. doi:10.1021/es990479z
- Sánchez-Sampedro, M.A., Fernández-Tárrago, J., Corchete, P., 2005. Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *J. Biotechnol.* 119, 60–69. doi:10.1016/J.JBIOTEC.2005.06.012
- Shannon, C.E., 1948. A Mathematical Theory of Communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27, 379–423.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1964. The Mathematical Theory of Communication. Univ. Illinois Press. Urban.
- Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163, 688.
- Smith, S.E., Read, D.J., 2008. Mycorrhizal Symbiosis, 3rd ed. Academic Press.
- Stephenson, G.L., Kuperman, R.G., Linder, G.L., Visser, S., 2002. Toxicity tests for assessing contaminated soils and ground water. In: (Eds.), in: Sunahara, G.I., Renoux, A.Y., Thellen, C., Gaudet, C.L., Pilon, A. (Eds.), *Environmental Analysis of Contaminated Sites*. Wiley, New York, pp. 25–43.
- Sýkorová, Z., Ineichen, K., Wiemken, A., Redecker, D., 2007. The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza* 18, 1–14. doi:10.1007/s00572-007-0147-0
- US Environmental Protection Agency, 2004. Risk assessment guidance for superfund

- (RAGS). Volume I. Human health evaluation manual (HHEM). Part E. Supplemental guidance for dermal risk assessment, Office of Superfund Remediation and Technology Innovation U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- US Environmental Protection Agency, E.R.L., 2007. method 8290A: Polychlorinated dibenzodioxins and polychlorinated dibenzofurans by high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry.
- US Environmental Protection Agency, E.R.L., 1989. Ecological Assessment of Hazardous Waste Sites : A Field and Laboratory. Washington, DC 20460.
- USAID, 2012. Litani River basin management plan - Volume I : Current Situation.
- USAID, 2011a. Litani River Basin Management Support Program-Water Quality Survey-Dry Season Volume II-Appendices.
- USAID, 2011b. Litani River Basin Management Support Program- Water Quality Survey - Dry Season (Summer 2010).
- USDA, 1999. Soil Taxonomy. A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys, Second Edi. ed. Soil Survey Staff, Washington, DC.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N., Peterson, R.E., 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.* 93, 223–241. doi:10.1093/toxsci/kfl055.
- Verdin, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Fontaine, J., Grandmougin-Ferjani, A., Durand, R., 2006. Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza* 16, 397–405. doi:10.1007/s00572-006-0055-8.
- Xiong, Z.T., Hu, H.X., Wang, Y.X., Fu, G.H., Tan, Z.Q., Yan, G.A., 1997. Comparative analyses of soil contaminant levels and plant species diversity at developing and disused oil well sites in Qianjiang oilfield, China. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 667–672. doi:10.1007/s001289900385
- Yang, Y., Song, Y., Scheller, H. V., Ghosh, A., Ban, Y., Chen, H., Tang, M., 2015. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Robinia pseudoacacia* in uncontaminated and heavy metal contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* 86, 146–158. doi:10.1016/j.soilbio.2015.03.018
- Zangaro, W., Rostirola, L.V., Carrenho, P.B. de S., Alves, R. de A., Lescano, L.E.A.M., Rondina, A.B.L., Nogueira, M.A., Carrenho, R., 2013. Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. *Mycorrhiza* 23, 221–233. doi:10.1007/s00572-012-0464-9
- Zelles, L., Bai, Q.Y., 1993. Fractionation of Fatty Acids Derived from Soil Lipids by Solid Phase Extraction and their Quantitative Analysis by GC-MS. *Soil Biol. Biochem.* 25, 495–507. doi:10.1016/0038-0717(93)90075-M

Présentation de la publication 2

Un des verrous qui limite l'usage de la phytoremédiation comme méthode de dépollution des sites contaminés est la rentabilité socio-économique de ce mode de gestion. En effet, la rentabilité économique et l'acceptabilité sociale sont des critères qui permettent de garantir la viabilité du mode de gestion envisagé et ces critères dépendent intimement des filières de valorisation de la biomasse végétale produite sur ces sols contaminés.

Le principal frein au développement de ces filières est la mise en adéquation entre le type, la quantité et la qualité de la biomasse produite (teneur éventuelle en contaminants) et l'accès à une filière de valorisation à proximité du lieu de production afin de garantir sa rentabilité économique. Parmi les filières de valorisation éco-innovantes présentant a priori une rentabilité supérieure aux cultures « traditionnelles », la culture de PPAM productrices HE a été suggérée comme une option possible et prometteuse (Lal et al., 2013 ; Verma et al., 2014). En effet, la demande mondiale en HE est en constante augmentation et devrait atteindre 5000 milliards de dollars d'ici la fin de l'année 2050 (Verma et al., 2014). Pour répondre à cette demande, l'expansion de sa production vers les terrains contaminés pourrait être une option viable d'autant plus que ces composés à haute valeur ajoutée peuvent être utilisés dans diverses industries non-alimentaires (cosmétiques, pharmaceutiques et phytosanitaires).

Différents travaux ont démontré l'intérêt des PPAM telles que le romarin, la lavande ou le thym dans l'immobilisation des ETM dans le sol (Madejon et al., 2009 ; Parra et al., 2014). En revanche, très peu de travaux ont montré l'intérêt de ces plantes dans le cadre de la phytoremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures aliphatiques. Par ailleurs, la colonisation des racines par les CMA permet d'accroître la dissipation des polluants organiques tels que les alcanes dans le sol (Lenoir et al., 2016b) mais aussi la croissance des plantes et leur tolérance à la toxicité de ces polluants (Lenoir et al., 2016a). En outre, la mycorhization améliore la production des HE grâce à des modifications métaboliques physiologiques (ex : l'amélioration de la nutrition phosphatée (Tarraf et al., 2017 ; Zeng et

al., 2013)) et anatomiques (ex : augmentation de la densité des trichomes glandulaires (Copetta et al., 2006 ; Rydlová et al., 2016 ; Tarraf et al., 2017 ; Zeng et al., 2013)) permettant d'accroître la synthèse de métabolites secondaires.

C'est pourquoi, la phytoremédiation assistée par les CMA du site expérimental de la Bekaa, a été évaluée à la fois en microcosmes et in situ, sur la parcelle décrite dans l'article 1 en utilisant une plante aromatique productrice d'HE, l'origan (*Origanum syriacum* L.). Cette dernière est une plante aromatique largement cultivée au Liban et dont les HE sont utilisés en médecine traditionnelle.

L'expérience in situ a été menée en cultivant 9 plantules d'origan distantes de 30 cm les unes des autres dans 4 quadrats de 1 m² délimités sur la parcelle expérimentale de la Bekaa. Un mélange de sol homogène de la Bekaa a été utilisé pour l'expérience en microcosme. Ce dernier comprend les conditions stérilisé inoculé, stérilisé non inoculé, non stérilisé inoculé et non stérilisé non inoculé du sol ; afin d'évaluer l'intérêt de l'inoculation et de la stérilisation des sols. Après 16 semaines de culture, les biomasses foliaires et racinaires, les taux de colonisation des racines d'Origan, ainsi que les concentrations résiduelles d'alcanes dans les sols ont été mesurées. A partir de la biomasse produite dans les deux conditions expérimentales, les HE ont été extraites par hydrodistillation et leur composition chimique ainsi que l'éventuel transfert des alcanes dans les HE ont été évalués.

Nos résultats montrent une dissipation significative des alcanes in situ, estimée à 11 %. De plus, aucune trace d'alcane n'a été détectée dans les HE extraites de la biomasse obtenue sur le sol contaminé. D'autre part, la colonisation arbusculaire en microcosme permet l'amélioration des taux de colonisation et de la biomasse aérienne sur du sol non stérilisé. Par ailleurs, l'inoculation améliore la production du carvacrol (de 213 et 7,8 % sur du sol non stérilisé et stérilisé respectivement) et réduit la synthèse du thymol (de 30 et 8,7 % sur du sol non stérilisé et stérilisé respectivement) par rapport aux conditions non inoculées. Par conséquent, l'origan (*Origanum syriacum*) peut être utilisé en phytoremédiation des sols pollués par les alcanes et de produire des HE à pouvoirs antifongiques, antioxydants et anti-inflammatoires. En effet, l'HE d'origan inhibe la croissance mycélienne de *Fusarium culmorum* par contact direct ainsi que par volatilité, avec une efficacité réduite lorsque les HE sont encapsulés dans des cyclodextrines. Par ailleurs, l'encapsulation par les cyclodextrines n'apporte pas de différence significative pour les activités antioxydantes et anti-inflammatoires de l'HE d'origan.

Publication 2 : Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoremediation by *Origanum syriacum*: efficacy on pollutant dissipation and essential oil production

Imad El-Alam^{1,3}, Raviella Zgheib², Marc El Beyrouthy², Anthony Verdin¹, Joël Fontaine¹, Ramez Chahine³, Hassane Makhoul³, Anissa Lounès-Hadj Sahraoui^{1,*}

1: Univ Littoral Côte d'Opale, EA 4492 – UCEIV – Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, SFR Condorcet FR CNRS 3417, F-62228 Calais cedex, France.

2: Department of Agricultural Sciences, Holy Spirit University of Kaslik, Kaslik, B.P. 446, Jounieh, Lebanon

3: Oxidative Stress and Antioxidants group, Doctoral School of Sciences and Technologies, Lebanese University, Lebanon

*Corresponding author E-mail: lounes@univ-littoral.fr

Abstract:

The cultivation of aromatic crops in phytoremediation is a profitable and a feasible option to valorize plant biomass generated from polluted soils through the production of essential oils (EO). This study aims at evaluating the efficacy of an aromatic plant, *Origanum syriacum* L. on alkane dissipation and EO production both in in situ and in microcosm experiments after 16 week-cultures. Significant alkane dissipation, estimated at 11 %, was observed in in situ experiment. Furthermore, no alkanes were detected in EO extracted from the biomass harvested from the contaminated soil. Mycorrhizal inoculation showed significant enhancements in mycorrhizal rates and shoot biomass production in the microcosm experiment with the non-sterilized soil. On the other hand, mycorrhizal inoculation increased carvacrol (by 213 and 7.8 % on non-sterilized and sterilized soils respectively) and reduced thymol (by 30 and 8.7 % on non-sterilized and sterilized soils respectively) productions in comparison to non-inoculated conditions. Our findings also revealed that *Origanum syriacum* plants could be used in phytoremediation of alkane-polluted soil to produce EO with potential antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities. Indeed, oregano EO inhibited the growth of *Fusarium culmorum* plant pathogen by both direct contact and volatility assays. Besides, *Origanum syriacum* EO revealed antioxidant and anti-inflammatory activities. While EO encapsulation with cyclodextrins (HP- β -CD) reduce EO antifungal properties for direct contact and volatility assays, no significant differences were observed in IC₅₀ of antioxidant and anti-inflammatory activities of EO *Origanum syriacum* with respect to free-HP- β -CD treatment.

Key words: alkane pollution - phytoremediation - *Origanum syriacum* - essential oil - arbuscular mycorrhizal fungi

1. Introduction

An increasingly industrialized global economy over the last century has led to dramatically elevated releases of anthropogenic chemicals into the environment. Prevalent contaminants include petroleum hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons, halogenated hydrocarbons, pesticides and solvents. These persistent organic pollutants can remain in environment for a long period and have the potential to cause adverse environmental effects (Abrahams, 2002). That's why soil remediation arouses a great interest. In contrast to conventional physico-chemical soil remediation techniques, which often involve high economic costs, irreversible changes in soil structure and critical damage to soil macro- and microbiota, phytoremediation can provide a cost-effective and environmentally-friendly solution to soil contamination (Agnello et al., 2016). Indeed, several studies have evidenced that the use of plants and their associated microorganisms can promote the rhizodegradation of organic contaminants (Lenoir et al., 2016a; Nwoko, 2014; Wu et al., 2011; Yu et al., 2011).

To enhance phytoremediation efficiency, a biological amendment consisting of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) could be brought. These fungi are obligate biotrophs, associated with roots of the majority of plants in a close symbiotic relation, improving plant growth and health by (i) enhancing mineral and water nutrition, (ii) exploring a larger volume of soil, (iii) alleviating biotic and abiotic stresses in host plant and (iv) participating in organic pollutant dissipation (Lenoir et al., 2016b). Some investigations showed that AMF can facilitate plant establishment and survival in hydrocarbons contaminated soil and also contribute to increase their biodegradation in plant rhizosphere (Lenoir et al., 2016a). Choice of the selected plant species is a crucial aspect for phytoremediation success. There are several key criteria to be considered during plant selection: (i) plant resistance to high contaminant concentrations, (ii) high valuable economic crop and (iii) no or least risk of contaminant in use of end products (Pandey et al., 2015). The cultivation of aromatic crops in phytoremediation has often been suggested as a profitable and a feasible option since studies have shown that contaminant accumulated by those species are not included in the essential oils (EO) (Angelova et al., 2016; Asgari Lajayer et al., 2017; Zheljazkov et al., 2008). Furthermore, the global demand of EO from aromatic plants is continuously increasing nowadays (Verma et al., 2014). EO are used in the perfumery, cosmetic, soaps and detergents industries. Due to their major active compounds, EO are widely used for bactericidal, virucidal, fungicidal, antiparasitic,

insecticidal, medicinal applications, and sanitary industries (Bakkali et al., 2008). Aromatic and medicinal plants such as *Bidens tripartita* L., *Leonurus cardiaca* L., *Marrubium vulgare* L., *Melissa officinalis* L. and *Origanum heracleoticum* L., (Zheljazkov et al., 2008), as well as dill (*Anethum graveolens* L., cv. Hercules), peppermint (*Mentha x piperita* L., cv. Mitchum), and basil (*Ocimum basilicum* L., cv. Broad Leaf Italian) (Zheljazkov et al., 2006) were studied as alternative high value crops in moderate metal trace element soils, but few studies describe the use of aromatic plants in organic pollutant contaminated soils. *Origanum syriacum*, known as “zaatar or zoubaa” in Lebanon and one of the most popular herbs used in folk Lebanese medicine, is an aromatic plant species belonging to the Lamiaceae family, growing wild or cultivated (Zgheib et al. 2016).

The purpose of this work aims at evaluating the efficacy of phytoremediation by the aromatic crop, *Origanum syriacum* L., on alkane dissipation as well as on EO composition and production. To investigate the potential role of arbuscular mycorrhizal fungi amendment, both in in situ and microcosm experiments were undertaken. Finally, biological (antifungal, antioxidant and anti-inflammatory) activities of EO extracted from *Origanum syriacum* were also assessed.

2. Materials and Methods

2.1. AMF-assisted phytoremediation

2.1.1. Experimental site and soil sampling

The experimental site is located in the Upper Litani Basin, in Marj village (Latitude: 33.766404, Longitude: 35.876819). The soil is an agricultural soil directly irrigated by Litani River's wastewater in which numerous organic and inorganic pollutants have been detected (chlorinated organic substances, fecal coliform, salmonella, and other microbiological parameters, metal trace elements, crude oils, pesticides) (El-Fadel et al., 2003; Nehme et al., 2014b; USAID, 2011a, 2011b). The soil is homogeneously contaminated by a mixture of 32 alkanes at a concentration of 2541.1 mg.Kg⁻¹ of soil. 4 quadrats of 1 m² were delimited serving for in situ phytoremediation experiment in May 2017. The soil used in the microcosm experiment was collected in May 2017 from the first horizon of soil from 0 to 25 cm

2.1.2. Plant material

Origanum syriacum L. was used in this study. The botanical identification of plant sample was carried according to the New Flora of Lebanon and Syria as described by Mouterde (1983). A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Faculty of Agricultural and Food Sciences of the Holy Spirit University of Kaslik (USEK).

2.1.3. Experimental design of the phytoremediation experiments

Phytoremediation experiments have been assessed in both in the experimental site (in situ experiment) and in microcosms.

For in situ experiment, 4 quadrats of 1 m² were cultivated by 9 *Origanum syriacum* seedlings (30 cm apart from each other). Results were expressed by the mean of the 4 quadrats.

For microcosm experiment, the polluted soil was dried, sieved at 2 mm and homogenized. A fraction of soil was sterilized by autoclave (3 times at 121 °C), while the other part was not sterilized. The experiment was conducted in the presence and the absence of an AMF inoculum, Symbivit® containing 6 AMF morphotypes (*Claroideoglomus etunicatum*, *Glomus microaggregatum*, *Rhizophagus intraradices*, *Claroideoglomus claroideum*, *Funneliformis mosseae*, *Funneliformis geosporum*), in both sterilized and non-sterilized conditions. 500 g of soil (sterilized or non-sterilized soil) were inoculated with 30 g of AMF inoculum or its equivalent substrate. These conditions were repeated 10 times. In each condition, a seedling of *Origanum syriacum* was cultivated. 3 pots (10 cm x 10 cm) were left non-vegetated serving as control microcosms.

After 16 weeks of culture, the residual concentrations of alkanes in soils were compared to the corresponding pre-cultivated values for in situ experiment and to the non-vegetated samples for microcosm condition in order to evaluate alkane's dissipation. Roots were rinsed and lyophilized prior measurement of their biomasses. Some of them were used for root colonization rate analysis and the rest was stored at 4 °C and Fresh shoot biomasses were measured and only foliar biomasses were directly used for EO extraction.

2.1.4. EO extraction

EO were extracted from foliar biomasses obtained from both in situ and microcosm experiments using Clevenger-type apparatus for 3 hours until no more EO was recovered, in accordance to the method described in the Europe Pharmacopoeia (1997). EO were stored at 4

°C in tightly closed glass vials until their analysis. Yields of extraction were evaluated by measuring the volume of the extracted EO from the plant material as follow:

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{EO Volume (mL)}}{\text{Foliar biomass fresh weight (g)}} \times 100$$

2.1.5. Alkanes analysis

Total alkanes were extracted from both in situ and in microcosm soils according to Rahman method followed with minor modifications (20 ml of hexane to 5 g of soil, extraction time: 1 hour) (Rahman et al., 2003).

Hydrocarbon dissipation was calculated as follow:

$$\text{Hydrocarbon dissipation (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{Alkane concentration in treatment}}{\text{Alkane concentration in control}} \times 100 \right)$$

2.1.6. EO chemical composition and alkanes analysis

Identification of the main chemical compounds of the EO, as well as identification and quantification of alkanes in both in situ and in microcosm soils as well as in extracted EO were performed by GC and GC/MS as described by Zgheib et al. (2016).

GC Analyses: EO and alkanes compositions were determined by gas chromatography (Thermo Electron Corporation apparatus equipped with flame ionization detector) using a non-polar HP-5MS (5 % Phenyl Methyl Siloxane) capillary column (30 m length, 0.25 mm inner diameter, film thickness 0.25 µm) or a polar fused-silica HP Innowax capillary column (polyethylene glycol, 50 m length, 0.20 mm inner diameter, film thickness 0.20 µm). The oven temperature followed a gradient rising from 35 to 85 °C at 5 °C /min, held isothermal at 85 °C for 20 min, then rising from 85 to 300 °C at 10 °C /min, and finally held isothermal at 300 °C for 5 min; the injector temperature was 250 °C and detector temperature 310°C. The carrier gas was He at a rate of 0.8 mL/min. Aliquots of 1 µL of diluted samples (1:100 (v/v)) were injected both manually and in splitless mode.

GC/MS Analyses: In order to confirm the identification of the components, GC/MS analyses were performed using an Agilent 6890 gas chromatograph coupled with an Agilent 5975 mass-selective detector and equipped with an Agilent 7683 B auto sampler (injection of 1 µL of oil for each sample). The capillary columns and the GC conditions were as described above (cf. GC Analysis); Ion Source 18 and Transfer line temperatures were 310 °C and 320

°C, respectively. The mass spectrometer was in electron ionization mode at 70 eV and the mass range was: 50–400 amu (full scan mode).

Identification and Quantification of Essential-Oil Components and Alkanes: An n-alkane (C8-C40) mixture was analyzed under the same experimental GC/MS conditions to calculate the Kovats indexes (KI). Identification of individual EO components was based on comparison of their retention indices (RI), on both polar and non-polar columns, relative to the retention times (Rt) of the series of n-alkanes (C8-C40) with those of standard compounds obtained from Sigma-Aldrich (Germany) or with those of the literature as described by Davies (1990) and Jennings (2012). Further identification was made by comparison of their mass spectra on both columns with those listed in the commercial mass spectral libraries NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) and Wiley 275 computer Libraries, our home-made library constructed with pure compounds, or with published mass spectra as described by Adams (2007) and Jennings (2012), allowing a reliable confirmation of the identity of each component. Standards of some EO of known composition (such as the EO of *Rosmarinus officinalis* L. from Phytosun Aroms, Plélo, France) were also injected in similar conditions for the comparison of Rt and mass spectra. Relative percentages of oil constituents were calculated from the GC peak areas corrected using the Probabilistic Quotient Normalization (PQN), using the median of all the chromatograms as reference signal for the correction (Kohl et al., 2012).

2.2. Biological activities of *Origanum syriacum* EO

2.2.1. EO material

Limited quantities of *Origanum syriacum* EO were obtained in the in situ and microcosm experiments. Thus, *Origanum syriacum* EO tested in the current study was provided by the Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences at Holy Spirit University of Kaslik-Lebanon, and obtained by hydrodistillation process using Clevenger Type Apparatus. The plant material was harvested from Qartaba in July 2016.

2.2.2. Antifungal activity of EO extracts

Fusarium culmorum is a phytopathogen of wheat, barley, and oat, responsible for *Fusarium* head blight (FHB) and *Fusarium* crown rot (FCR) diseases. It also produces toxic secondary metabolites, mycotoxins, that lead to contamination of the grain harvested from infected ears and cause potential risk to human and animal health (Wagacha and Muthomi,

2007). Antifungal activity of the *Origanum syriacum* EO was tested against *F. culmorum* by two in vitro methods: direct contact (mycelial radial growth inhibition assay) and volatility assays.

Antifungal activities were assessed in the presence and the absence of cyclodextrins (HP- β -CD), cyclic oligosaccharides with hydrophilic surface and hydrophobic cavity that allow them to encapsulate EO and form inclusion complexes, which enhance their aqueous solubility and stability and maintain their bioactivity (Kfoury et al., 2016).

- Direct contact assay: antifungal activity by direct contact was assessed according to Huang et al. (2010) and Quiroga et al. (2001) followed with minor modifications. Mycelial discs of *F. culmorum* (0.9 cm) from the edge of a 7-day-old culture fungal colony were cut and placed at the center of a 9 cm Petri dish containing potato dextrose agar (PDA) culture medium (40 g.L⁻¹). *Origanum syriacum* EO was mixed with PDA medium at 50 °C in order to obtain final concentrations ranged from 0.01 % to 1 % of EO in the medium. This latter was previously sterilized by filtration and prepared in ethanolic solution 1 %. Direct contact assay was performed in the absence and the presence of HP- β -CD at final concentration 10 mM in the medium. Samples were incubated for 7 days at 20 °C, and subsequently the radius of mycelium growth was measured. Analyses were led in triplicates. Inhibition rate was calculated following the formula:

$$\text{Percentage of mycelial growth inhibition} = \frac{(X_0 - X_i)}{X_0} \times 100$$

where X_0 =Average diameter of the fungal colony in control; X_i =Average diameter of the fungal colony in treatment.

Graphical interpolation analysis was used to calculate the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value.

- Volatility assay: antifungal activity by volatility was assessed according to Abarca et al. (2016) followed with minor modifications. Mycelial discs of *F. culmorum* (0.9 cm) from the edge of a 7-day-old culture fungal colony were cut and placed at the center of a 5.5 cm Petri dish culture medium plate with PDA. This plate was stuck with PDA into a 9 cm Petri dish that contained EO solutions. These latter were previously sterilized by filtration and prepared in both ethanolic solution and HP- β -CD (10 mM). *Origaum syriacum* EO concentrations ranged from 0.01 % to 2 %. Samples were

incubated for 5 days at 20 °C, and subsequently the radius of mycelium growth was measured. Analyses were led in triplicates. Inhibition rate was calculated as follow:

$$\text{Percentage of mycelial growth inhibition} = \frac{(X_0 - X_i)}{X_0} \times 100$$

where X_0 = Average diameter of the fungal colony in control; X_i = Average diameter of the fungal colony in treatment.

Graphical interpolation analysis was used to calculate the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value.

2.2.3. Antioxidant activity of EO extracts

Antioxidant activity was assessed using the free radical, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) assay, as proposed by Brand-Williams et al. (1995), with slight modifications. Concentration ranges of EO (up to 5000 ppm) were prepared in ethanol. 0.2 mL of each EO concentration was dissolved in 2 mL of water or 2 mL of HP-β-CD (10 mM). Mixtures were vigorously mixed with 2 mL of ethanolic DPPH[•] solution (0.1 mM) and were shaken for 1 h at 25 °C in the dark and the absorbance was measured at 517 nm. The experiment was performed in triplicates. The antioxidant activity was calculated as follows:

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \frac{(A_0 - A_i)}{A_0} \times 100$$

where A_i and A_0 are the absorbance of sample and blank samples respectively.

The antioxidant activity was compared to that of the Trolox® standard (a vitamin E analog known for its antioxidant activity). The results were expressed in terms of Trolox® equivalent antioxidant capacity (TEAC) (μMol trolox/ g EO), by using a Trolox calibration curve prepared for a concentration range of 1.5-12.5 μM. Graphical interpolation analysis was used to calculate the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value.

2.2.4. Anti-inflammatory activity of EO extracts

Anti-inflammatory activity of EO was evaluated using the inhibition of albumin denaturation technique according to Mizushima and Kobayashi (1968) and Sakat et al. (2010) with minor modifications. A range of EO volumes (up to 150 μL) was added to 1 mL of bovine albumin serum (BSA) (0.2 % aqueous solution, pH adjusted at 6.8). This assay was performed in the absence and presence of HP-β-CD (10 mM) where EO were previously

mixed with their double volume of HP- β -CD. Samples were incubated at 37 °C for 20 min and then heated at 72 °C for 20 min. After cooling the samples, the turbidity was measured at 660 nm. The experiment was led in triplicates. Percent inhibition of albumin denaturation was calculated using the following equation:

$$\text{Inhibition rate} = \left(1 - \left(\frac{A_i - A_x}{A_0} \right) \right) \times 100$$

where A_i and A_x are the absorbances of the sample and its positive control respectively; A_0 is the absorbance of the blank sample.

Graphical interpolation analysis was used to calculate the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value.

2.3. Statistical analyses

All extractions and experiments were performed in triplicates. Significant differences between the means of the shoot and root biomasses, root colonization rate, as well as EO composition were assessed according to Fisher's least significant difference (LSD) test using Statgraphics Centurion 15.2.11.0.

Besides, the significant difference of each alkane's concentration between pre-and post-vegetated values in the in situ experiment, as well as between the results obtained for in situ and non-sterilized and non-inoculated soils by all experiments were evaluated by Student's t-test using the Statgraphics Centurion 15.2.11.0.

Moreover, the combined effect of sterilization and inoculation on EO composition was tested by the principal components analysis (PCA) using XLSTAT 2014.5.03.

In order to evaluate the significant difference between the means of antifungal (both direct contact and volatility assays), antioxidant and anti-inflammatory activities assays of EO extracts, ANCOVA test was performed using XLSTAT 2014.5.03.

The results were considered significantly different at the 0.05 level ($p < 0.05$) for all statistical tests.

3. Results

3.1. AMF-assisted phytoremediation

3.1.1. In situ experiment

3.1.1.1. *Origanum syriacum* shoot and root biomass

After 16 weeks of culture, shoot and root biomasses of in situ cultivated plants were 2.8 and 2 g respectively (Table 1).

3.1.1.1. *Origanum syriacum* root colonization rate

Microscopic observations of stained *Origanum syriacum* root samples obtained from the in situ experiment revealed the presence of AMF structures: arbuscules, vesicles and intraradical hyphae. Total root colonization rate was 25 % for oregano plants cultivated in the experimental site (Table 1).

Table 1 : Plant biomasses and root mycorrhizal rates obtained in microcosm and in in situ experiments

	in situ experiment	microcosm experiment			
		NSNI	NSI	SNI	SI
Shoot dry weight (g/plant)	2.86 ± 2.34	1.59 ± 1.56 ^a	3.52 ± 1.89 ^b	0.85 ± 0.37 ^a	1.15 ± 0.85 ^a
Root dry weight (g/plant)	2.02 ± 0.84	0.83 ± 0.82 ^a	0.85 ± 0.46 ^a	0.65 ± 0.28 ^a	0.80 ± 0.59 ^a
Mycorrhizal rate (%)	25.3 ± 2.7*	17.03 ± 3.3 ^a	51.1 ± 4.7 ^b	0 ^a	22.9 ± 4.6 ^a

NSNI: non sterilized-non inoculated soil; NSI: non sterilized-inoculated soil; SI: sterilized-inoculated soil; SI: sterilized-inoculated soil.

Values are depicted as mean ± standard deviation. Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$ as determined by Fisher's *least significant difference (LSD) test* in microcosm samples. Asterisk indicates significant difference between NSNI and in situ samples as determined by Student-t test.

3.1.1.2. Alkanes analysis in soils

After 16 weeks, total alkanes concentrations were measured in each in situ soil and compared to their corresponding pre-vegetation values (Figure 1 and Table 2). The total

alkane concentration was significantly lower in soil samples after oregano culture (1939.9 mg.Kg⁻¹ of soil) with respect to those obtained before vegetation (2161.9 mg.Kg⁻¹ of soil). Besides, total alkane's dissipation was only observed for nonane, decane, tetradecane, triacontane and hentriacontane, whereas, octane, undecane, dodecane, tridecane, phytane, tetratriacontane, heptatriacontane, octatriacontane, nonatriacontane and pristine were not detected in our soil.

Table 2: Alkane concentrations in in situ pre- and post-vegetated soils

Alkanes	Alkane concentrations (mg.Kg ⁻¹ of soil)	
	in pre-vegetated soil	in post-vegetated soil
Nonane	23.3 ± 5.7	nd
Decane	11.2 ± 3.1	nd
Tetradecane	270.03 ± 109.2	nd
Hexadecane	417.2 ± 287.9 ^a	182.5 ± 30.1 ^a
Heptadecane	12.7 ± 1.5 ^a	18.9 ± 37.9 ^a
Octadecane	258.03 ± 172.1 ^a	215.9 ± 169.1 ^a
Nonadecane	28.9 ± 45.9 ^a	326.8 ± 104.9 ^a
Eicosane	133.9 ± 72.1 ^a	134.8 ± 115.5 ^a
Heneicosane	47.8 ± 42.9 ^a	12.7 ± 9.2 ^a
Docosane	67.8 ± 52.9 ^a	63.8 ± 61.1 ^a
Tricosane	43.6 ± 32.9 ^a	23.4 ± 16.8 ^a
Tetracosane	63.4 ± 57.18 ^a	55.5 ± 48.6 ^a
Pentacosane	73.3 ± 62.1 ^a	113.2 ± 79.3 ^a
Hexacosane	98.9 ± 33.9 ^a	177.9 ± 119.3 ^a
Heptacosane	117.7 ± 27.7 ^a	166.8 ± 127.8 ^a
Octacosane	102.9 ± 48.2 ^a	118.19 ± 91.5 ^a
Nonacosane	189.4 ± 93.2 ^a	191.8 ± 139.7 ^a
Triacontane	56.9 ± 11.4	nd
Hentriacontane	57.9 ± 10.2	nd
Dotriacontane	10.4 ± 4.5 ^a	8.2 ± 2.2 ^a
Titriacontane	96.72 ± 69.9 ^a	83.5 ± 61.7 ^a
Pentatriacontane	26.5 ± 5.3 ^a	7.7 ± 1.5 ^a
Hexatriacontane	19.6 ± 2.6 ^a	38.1 ± 7.6 ^a
Total	2161.9 ± 186.2^a	1939.9 ± 229.6^b

Values are depicted as mean ± standard deviation. Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$ as determined by Student's t-test between pre-and post-vegetated values.

3.1.1.1. EO yield and chemical composition analyses

EO yield of extraction from oregano plants cultivated in situ was about 2.5 %. On the other hand, the results revealed that there is no transfer of alkanes in the extracted *Origanum syriacum* EO obtained from in situ experiment. Besides that, the chemical composition

analysis of these EO were mainly composed by carvacrol (55 %), thymol (15 %), γ -terpinene (10 %), p-cymene (9 %), α -terpinene (2 %) and β -caryophyllene (2 %) (Table 3).

Table 3: Yields and chemical composition of *Origanum syriacum* essential oil, harvested from microcosm and in in situ experiments

	in situ experiment	microcosm experiment			
		NSNI	NSI	SNI	SI
Total foliar biomass fresh weight (g)	12.1 $\pm$ 7.1	11.4	20.1	4.2	4.9
Essential oil volume (ml)	0.3 $\pm$ 0	0.4	0.3	0.1	0.2
Yield (%)	2.48 $\pm$ 1.3	3.51	1.49	2.38	4.08
EO composition (%)					
α -pinene	1.19 $\pm$ 0.62	1.47 $\pm$ 0.03 ^a	1.56 $\pm$ 0.03 ^a	0.77 $\pm$ 0.06 ^{ab}	nd
camphene	0.21 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0 ^a	0.17 $\pm$ 0.002 ^a	nd	nd
sabinene	0.28 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.01 ^a	0.30 $\pm$ 0.06 ^a	0.20 $\pm$ 0 ^c	0.13 $\pm$ 0 ^d
β -pinene	0.26 $\pm$ 0.02	nd	nd	nd	nd
1 octen 3 ol	0.17 $\pm$ 0.06	0.20 $\pm$ 0.003 ^a	0.30 $\pm$ 0.10 ^{ab}	0.35 $\pm$ 0.04 ^b	0.35 $\pm$ 0.04 ^b
myrcene	1.21 $\pm$ 0.14*	0.87 $\pm$ 0.002 ^a	1.64 $\pm$ 0.38 ^b	0.32 $\pm$ 0 ^c	0.32 $\pm$ 0 ^c
3-octanol	0.33 $\pm$ 0.06*	0.17 $\pm$ 0.002 ^a	nd	0.23 $\pm$ 0 ^c	0.23 $\pm$ 0 ^c
α -phellandrene	0.46 $\pm$ 0.05	0.43 $\pm$ 0.005 ^a	0.70 $\pm$ 0.26 ^b	0.24 $\pm$ 0 ^a	0.24 $\pm$ 0 ^a
α-terpinene	2.37 $\pm$ 0.38	2.10 $\pm$ 0.03^a	2.27 $\pm$ 0.46^a	1.13 $\pm$ 0.06^b	0.76 $\pm$ 0^b
p-cymene	8.87 $\pm$ 2.18*	14.83 $\pm$ 0.47^a	7.50 $\pm$ 1.35^b	5.97 $\pm$ 0.06^c	4.47 $\pm$ 0.12^d
trans- β -ocimene	0.08 $\pm$ 0.01	nd	0.20 $\pm$ 0 ^a	nd	nd
γ-terpinene	10.06 $\pm$ 1.76*	3.83 $\pm$ 0.08^a	6.04 $\pm$ 0.77^b	1.56 $\pm$ 0.03^c	1.56 $\pm$ 0.03^c
cis-sabinene hydrate	0.81 $\pm$ 0.06*	0.68 $\pm$ 0.06 ^{ab}	0.55 $\pm$ 0.37 ^a	0.80 $\pm$ 0 ^{ab}	0.98 $\pm$ 0.10 ^a
terpinolene	0.11 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.15 $\pm$ 0.04 ^b	0.09 $\pm$ 0 ^a	0.09 $\pm$ 0 ^a
α -terpineol	0.13 $\pm$ 0.08	0.26 $\pm$ 0.02 ^a	0.08 $\pm$ 0.04 ^b	0.10 $\pm$ 0 ^b	0.10 $\pm$ 0 ^b
terpinen-4-ol	0.18 $\pm$ 0.12	nd	0.16 $\pm$ 0.10	nd	nd
thymol methyl ether	0.13 $\pm$ 0.09	nd	nd	nd	nd
thymoquinone	0.35 $\pm$ 0.25	0.81 $\pm$ 0.07 ^a	0.29 $\pm$ 0 ^b	1.20 $\pm$ 0 ^c	1.70 $\pm$ 0 ^d
thymol	14.68 $\pm$ 13.49*	54.48 $\pm$ 0.03^a	37.80 $\pm$ 1.56^b	48.03 $\pm$ 0.12^c	43.83 $\pm$ 0.42^d
carvacrol	54.93 $\pm$ 21.80*	11.46 $\pm$ 0.17^a	35.84 $\pm$ 1.68^b	30.13 $\pm$ 0.06^c	32.47 $\pm$ 0.71^c
β-caryophyllene	1.98 $\pm$ 0.40	2.14 $\pm$ 0^a	1.93 $\pm$ 0.12^b	1.73 $\pm$ 0.06^{ac}	1.85 $\pm$ 0.05^c
α -bergamotene	nd	nd	0.08 $\pm$ 0.01	nd	nd
α -humulene	0.19 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0 ^a	0.34 $\pm$ 0.02 ^b	0.06 $\pm$ 0 ^c	0.06 $\pm$ 0 ^c
germacrene D	0.27 $\pm$ 0.21	0.07 $\pm$ 0 ^a	0.09 $\pm$ 0.01 ^b	0.10 $\pm$ 0 ^b	0.30 $\pm$ 0 ^c
γ -cadinene	0.10 $\pm$ 0.04	nd	0.08 $\pm$ 0 ^b	0.10 $\pm$ 0 ^c	0.10 $\pm$ 0 ^c
δ -cadinene	0.09 $\pm$ 0.04	nd	0.06 $\pm$ 0 ^b	0.50 $\pm$ 0 ^c	0.90 $\pm$ 0 ^d
caryophyllene oxide	0.21 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0 ^a	0.10 $\pm$ 0 ^b	0.20 $\pm$ 0 ^c	0.30 $\pm$ 0 ^d
α -cadinol	nd	nd	0.17 $\pm$ 0.13	nd	nd

NSNI: non sterilized-non inoculated soil; NSI: non sterilized-inoculated soil; SI: sterilized-inoculated soil; SI: sterilized-inoculated soil. nd: not detected.

Values are depicted as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$ as determined by Fisher's *test* in microcosm samples. Asterisk indicates significant difference between NSNI and in situ samples as determined by Student-t test

3.1.2. Microcosm experiment

3.1.2.1. *Origanum syriacum* shoot and root biomasses

The root biomasses obtained on non-sterilized soil were 0.83 and 0.85 g for non-inoculated and inoculated conditions respectively. Besides, root biomasses obtained on sterilized soils were 0.85 and 1.15 g for non-inoculated and inoculated conditions respectively. No significant difference was observed between the root dry weight of inoculated and non-inoculated plants grown in sterilized or non-sterilized soils. While on sterilized soil, no difference was revealed between shoot biomass of inoculated and non-inoculated plants, concerning non-sterilized soil, shoot biomass was significantly higher for inoculated oregano plants (3.52 g) in comparison with non-inoculated ones (1.59 g) (Table 1).

3.1.2.2. *Origanum syriacum* root colonization rate

Total root colonization levels were about 51 and 23 % for inoculated oregano cultivated respectively on non-sterilized and sterilized soils (Table 1). No AMF colonization was observed in the absence of inoculation on sterilized soil, while root colonization rate was about 17 % on non-inoculated and non-sterilized soil.

3.1.2.3. Alkanes analysis in soils

Total alkane concentrations were measured in each microcosm and compared to their corresponding values obtained in non-vegetated microcosm (Figure 1). For all microcosm conditions, no significant difference on alkane concentrations was observed for vegetated soils with respect to the non-vegetated ones. Besides, the sterilization by autoclave did not affect the composition of alkanes in soils (data not shown).

3.1.2.4. EO yield and chemical composition analyses

Yields of EO extracted from oregano plant cultivated in microcosm experiment varied between 1.5 and 4.1 % (Table 3). On the other hand, the analysis of alkanes revealed no transfer in the extracted *Origanum syriacum* EO in all experimental conditions (data not shown). Besides, the composition of the EO varied slightly amongst in microcosm conditions

with higher thymol proportion. Moreover, the inoculation significantly increased the concentration of carvacrol and reduced the concentration of thymol and p-cymene. Significant differences were also observed with α -terpinene and β -caryophyllene only on non-sterilized and inoculated microcosm with respect to non-inoculated ones.

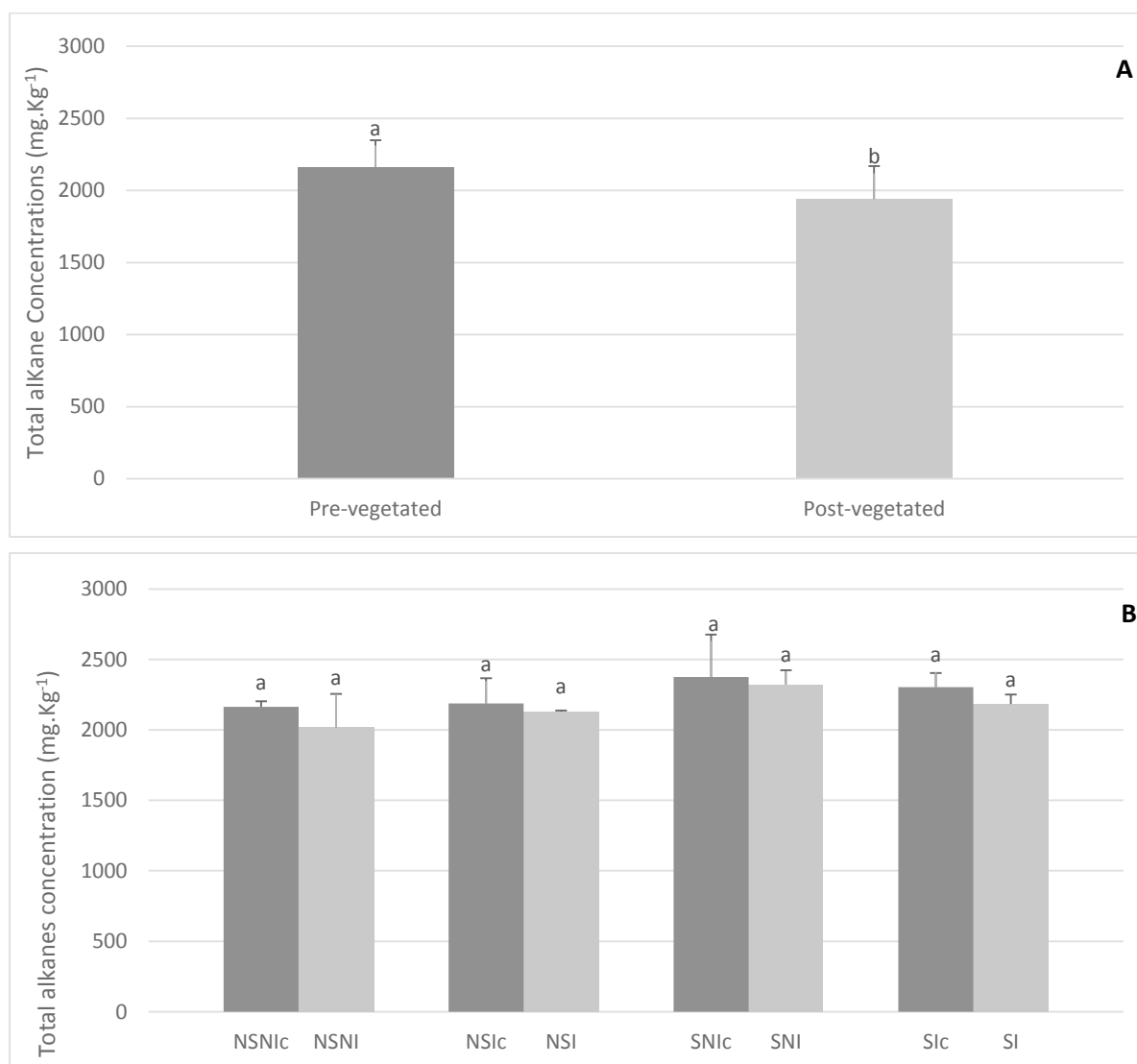


Figure 1: Total alkane concentrations in (a) in situ and (b) microcosm experiment

(A): Values are depicted as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$ as determined by *Student's t*-test between pre-and post-vegetated values.

(B): NSNI: non sterilized-non inoculated soil; NSI: non sterilized-inoculated soil; SI: sterilized-inoculated soil; SI: sterilized-inoculated soil; c: alkane concentration in non-vegetated microcosm serving as control.

Values are depicted as mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$ as determined by *Student's t*-test between each condition and its corresponding non-cultivated control.

3.1.3. Effect of phytoremediation conditions on EO chemical composition

The principal components analysis (PCA), a multivariate statistical method, was conducted, using the relative proportion of the major constituents (α -terpinene, p-cymene, γ -terpinene, thymol, carvacrol and β -caryophyllene), in order to (a) extract more valuable information, (b) investigate the separation between samples and the main chemical constituents, (c) evaluate the chemical variability according to inoculation and sterilization and (d) to classify the chemotype. Figure 2 represents the main results as obtained by PCA revealing that the first two principal components accounted for 99.47 % of the variability. The EO samples were clearly separated into three groups. A separation of the in situ and microcosm experiment oil samples is clearly shown along PC2. The in situ EO samples were mainly distinguished by the dominance of carvacrol highlighting carvacrol chemotype in these samples. EO extracted from oregano cultivated in non-sterilized and non inoculated soils is distributed in a group with relatively higher proportion of thymol as a principal constituent marking thymol chemotype. The EO samples obtained from non sterilized-inoculated, sterilized-inoculated and sterilized-non inoculated soils are characterized by an intermediate chemotype: thymol/carvacrol. PCA highlighted the existence of three different chemotypes in *Origanum syriacum* EO proving the existence of chemical variability: carvacrol, thymol and thymol/carvacrol. Moreover, these findings demonstrated that inoculation, sterilization and alkane concentration did not affect EO chemotype.

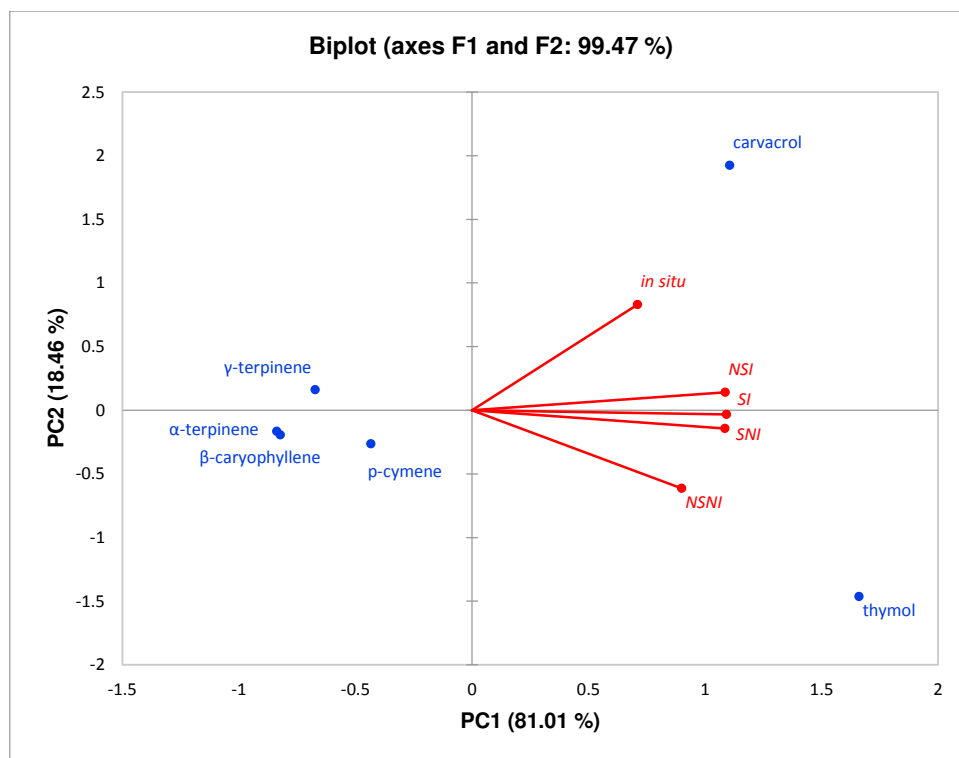


Figure 2: Principal component projection plot of PC1 and PC2 scores and loadings indicating chemotypes within *Origanum syriacum* based on chemical composition of the essential oils
 NSNI: non sterilized-non inoculated soil; NSI: non sterilized-inoculated soil; SI: sterilized-inoculated soil; SI: sterilized-inoculated soil.

3.2. Biological activities of *Origanum syriacum* EO

3.2.1. EO composition

Origanum syriacum EO used for biological activities assessment is found to be a carvacrol chemotype. It's mainly composed of 51.4 % carvacrol, 29.2 % thymol, 4.7 % p-cymene, 4.2 % γ-terpinene and 0.9 % β-caryophyllene.

3.2.2. Antifungal activity of EO extracts

Results of in vitro antifungal activity against *Fusarium culmorum*, by both direct contact and volatility assays, showed that *Origanum syriacum* EO inhibit the growth of this phytopathogen fungus in the presence and the absence of HP-β-CD. Indeed, in free-HP-β-CD treatment, the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) obtained by direct contact assay (0.16 g.L⁻¹) was lower than that obtained by volatility assay (0.77 g.L⁻¹).

Besides, significant differences were observed between the IC₅₀ obtained in the presence and the absence of HP-β-CD. In the presence of HP-β-CD, the IC₅₀ obtained by both direct

contact and volatility assays were 1.36 g.L⁻¹ and 2.29 g.L⁻¹ respectively. These results are higher than those obtained in free-HP-β-CD treatment.

3.2.3. Antioxidant activity

Results of DPPH free radical scavenging ability of *Origanum syriacum* EO are expressed by the IC₅₀ and in terms of Trolox® equivalent antioxidant capacity (TEAC). In the absence of HP-β-CD, IC₅₀ of EO antioxidant activity assay is 0.09 g.L⁻¹ while no significant difference was obtained in the presence of HP-β-CD where IC₅₀ was 0.1 g.L⁻¹. These results showed that *Origanum syriacum* EO antioxidant activity was 165 and 143 fold-higher than those obtained by the Trolox standard, in absence and presence of HP-β-CD respectively.

3.2.4. Anti-inflammatory activity

IC₅₀ results obtained for the anti-inflammatory activity of *origanum* EO were 5.5 and 3.3 g.L⁻¹ in the presence and the absence of HP-β-CD respectively. Once again, HP-β-CD did not show any beneficial effect on obtained IC₅₀.

4. Discussion

The use of aromatic plants either than edible crops is a new non-alimentary valorization process of phytoremediation. Indeed, the aromatic plant biomasses produced on polluted soil are destined for EO production. These latters possess a large sector of application due to their biological activities. Therefore, in the current study, *Origanum syriacum* was studied for its potential phytoremediation ability of an aged-alkane contaminated soil located at Marj-Bekaa, Lebanon. The interest of introducing commercial biological amendment made of AMF in contaminated soils to improve phytoremediation efficacy was also assessed in microcosm conditions.

After 16 weeks of culture, moderate spontaneous AMF oregano root colonization were observed both in microcosm (non-sterilized and non-inoculated soil) and in in situ experiments. This is due to the presence of autochthonous AMF spores in the aged-contaminated soil. Indeed, based on morphological characters, 3 AMF species were identified in the studied contaminated soil (*Funelliformis mosseae*, *Septoglomus constrictum* and *Claroideoglomus lamellosum*, data not shown). While AMF diversities found in non-disturbed soils can reach up to 43 - 52 AMF taxa in grassland and forests respectively

(Zangaro et al., 2013), the AMF spore diversity identified in our conditions was limited. This observation could be explained by the agricultural land use intensity, the soil contamination but also by the identification method used in the present work which included the only sporulating species present at the harvesting time. Indeed, more sensitive molecular methods allowed to identify more species in heavily polluted soils (Hassan et al., 2011; Iffis et al., 2014). Addition of commercial mycorrhizal inoculum in the soil of microcosm experiment led to significant improvement of colonization rate of *Origanum syriacum* roots in comparison with non-inoculated conditions. Nevertheless, in spite of the moderate colonization rate obtained in the microcosm experiment, arbuscular mycorrhizal inoculation significantly increased the shoot biomass of oregano plants but only in non-sterilized soil. It is well known that arbuscular mycorrhizal fungi improve plant growth by (i) exploring a larger volume of soil, (ii) enhancing the mineral (phosphate, nitrogen, oligo-elements) and water nutritional state of their hosts, (iii) alleviating biotic and abiotic stresses such as pollution in host plant (Hart and Forsythe, 2012; Smith and Smith, 2011) and also by contributing in organic pollutant dissipation (Lenoir et al., 2016b).

Indeed, in the current study, alkane dissipation rate was obtained in in situ experiment after 16 weeks of oregano growth. Shorter alkane chains such as nonane, decane and tetradecane as well as longer carbon chain like triacontane and hentriacontane were completely dissipated. Because of their linear chemical structure, alkanes could be degraded rapidly in soil by microbial communities (Ji et al., 2013; Rojo, 2009; Wang and Shao, 2013). Similar results were reported by Lenoir et al. (2016b) using inoculated wheat to remediate aged-alkane polluted soil. Organic pollutants such as alkanes are mainly metabolized in soil through rhizodegradation. Indeed, plant roots exude a set of enzymes like peroxidases, catalases, dehalogenases, nitroreductases and laccases which contribute to pollutant degradation in soil (Alagić et al., 2015; Dorantes et al., 2012; Haritash and Kaushik, 2009). In addition, some rhizosphere microbial populations participate in the remediation of polluted soils by using the organic pollutants as carbon and energy substrates for their growth. A stimulation of microbial growth is driven by the abundant energy offered by root exudates (mainly sugars and organic acids) and oxygen (Bais et al., 2006; El-Shatnawi and Makhadmeh, 2001; Gerhardt et al., 2009) but also flavonoids, terpenes or lignin-derived compounds that possess similar chemical structures to those of contaminants (Wojtera-Kwiczor et al., 2014). Therefore, they may act as inducers of genes involved in contaminant degradation pathways (Segura et al., 2009). Several studies demonstrated that alkane dissipation resulted from stimulation of rhizosphere bacteria with degradative abilities such as *Pseudomonas putida*,

Pseudomonas aeruginosa, *Geobacillus jurassicus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Dietzia cinnamea* using alkane hydroxylases, soluble cytochrome P450 degradative enzymes (Chen et al., 2017; Ji et al., 2013; Ramadass et al., 2016; Rojo, 2009). On the other hand, although many investigations described a better hydrocarbon phytoremediation efficiency using mycorrhizal plants (Alarcón et al., 2008; Joner and Leyval, 2003; Nwoko, 2014; Zhang et al., 2010; Zhou et al., 2013). The non-significant enhancement of alkane dissipation was detected in our experimental conditions, may be due to the low root system development which lead to low alkane degradative bacteria stimulation.

Furthermore, no alkanes were detected in the EO extracted from the plant biomass harvested from the polluted soil indicating that no pollutant transfer occurred. The absence of alkanes in the EO may be due firstly to their low transfer in shoots which was showed in previous study by Lenoir et al. (2016b). To the best of our knowledge, many works showed the absence or the low accumulation of metal trace elements in EO (Angelova et al., 2016; Lal et al., 2013; Zheljazkov et al., 2008, 2006; Zheljazkov and Nielsen, 1996), but limited studies addressed the question of organic pollutant transfer in the EO.

Moreover, the yields of extracted EO ranged from 1.4 to 4 in microcosm experiment and about 2.5 in in situ experiment. These findings are in agreement with those found in the literature (Gendy et al., 2015; Hassiotis et al., 2014; Marzoug et al., 2011). This variability in the yield production of *Origanum syriacum* EO could be related to the interaction between biotic (telluric microorganisms) and abiotic factors such as environmental and geographical adaptation (temperature, climate, altitude, light, etc.) (De Falco et al., 2013; Hassiotis et al., 2014).

On the other hand, the analysis of the main compounds of oregano EO appointed out composition variability within microcosm and in situ experiments. Whereas carvacrol was the major compound of the extracted EO from the biomass produced in in situ experiment, it was thymol from microcosm experiment. The observed polymorphism between the composition of the EO obtained on in situ and non-sterilized and non-inoculated in microcosm conditions could be attributed to edaphic factors, ecological, geographical, altitude and environmental factors. Indeed, our results were in accordance with Zgheib et al. (2016) who proved that the EO obtained from the higher altitude *Origanum suriacum* EO were found to be carvacrol-chemotype, whilst coastal ones were found to be thymol-chemotype. Moreover, the EO extracted from oregano plant grown on compost at USEK laboratory is found to be a thymol-chemotype which confirmed our results (data not shown). Furthermore, our findings showed that mycorrhizal inoculation affected the EO chemotype. Indeed, the concentration of

carvacrol was higher in inoculated conditions with respect to non-inoculated ones, while the concentrations of thymol decreased with inoculation. Thus, regarding to their chemical composition, the obtained EO could be divided into three groups: carvacrol chemotype group including the in situ EO samples, thymol chemotype group including non-sterilized and non inoculated EO sample as well as the intermediate chemotype: thymol/carvacrol including non sterilized-inoculated, sterilized-inoculated and sterilized-non inoculated EO samples. The observed effect of the inoculation on the composition of EO may be due to the alteration of the biosynthesis pathway of carvacrol and thymol on inoculated soils with respect to non-inoculated ones (Rydlová et al., 2016). Indeed, AMF symbiosis is known to enhance the contents of some secondary metabolites of medicinal plants by increasing the density of glandular trichomes (Copetta et al., 2006) and enhancing the phosphorus plant nutrition (Tarraf et al., 2017; Zeng et al., 2013). Nevertheless, there are contrasting investigations that AMF symbiosis can change the chemical composition in medicinal plants (Khaosaad et al., 2006; Tarraf et al., 2017; Zeng et al., 2013). Further biomolecular assays should be carried out to check the alteration or not of chemical components biosynthesis pathway by AMF inoculation.

Moreover, as limited quantities of *Origanum syriacum* EO were obtained in whole of our experiments, the antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Origanum syriacum* EO were assessed using a control EO (USEK laboratory) with similar composition as the EO obtained in situ by the current study. The results showed that oregano EO had a great interest to control *Fusarium culmorum* growth by both direct contact and volatility assays, with higher efficiency for the direct contact method. Indeed, the half minimum inhibitory concentration (IC₅₀) obtained by volatility assay is 4.8-fold higher than the IC₅₀ obtained by direct contact. These findings were in accordance with literature were *Origanum syriacum* EO showed a great interest at inhibiting *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cineria* mycelial growth (Daouk and Dagher, 1995; Ibrahim et al., 2012; Mohammadi et al., 2012), as well as *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* (Gendy et al., 2015).

Moreover, our results showed that EO extracted from *Origanum syriacum* presented important antioxidant and anti-inflammatory activities. IC₅₀ obtained with antioxidant assay was 0.09 g.L⁻¹, a value 165-fold higher than that obtained with Trolox standard. This result is in agreement with the range of IC₅₀ found in the literature (0.001 to 1.5 g.L⁻¹) (Ben Hsouna et al., 2013; Berka-Zougali et al., 2012; Loizzo et al., 2009; Marzoug et al., 2011; Ye et al., 2013). In the same way, the IC₅₀ obtained for the anti-inflammatory assay of oregano EO

(5.5 g.L⁻¹) exceeded those found in the literature (0.07 up to 0.4 g.L⁻¹) (Khobragade and Bhande, 2012; Kumar et al., 2013; Sakat et al., 2010). Moreover, the encapsulation of EO in cyclodextrins (HP- β -CD) reduce EO antifungal properties. Indeed, in the presence of HP- β -CD, the IC₅₀ found by both methods was higher than those obtained in free-HP- β -CD treatment for both direct contact and volatility antifungal assays. This may be explained by the fact that HP- β -CD encapsulation delays its host release in the medium. However, HP- β -CD did not provide significant differences of IC₅₀ obtained for antioxidant and anti-inflammatory activities of *Origanum syriacum* with respect to free-HP- β -CD treatment.

5. Conclusion

Results presented herein revealed that aromatic crops such as *Origanum syriacum* is able to grow in an alkane-contaminated agricultural soil and presents a phytoremediation potential without any transfer of pollutants in EO. Mycorrhizal inoculation influenced EO composition. Thus, the use of such crops in order to produce EO can provide high economic return and contaminant-free final product. This latter showed a great potential as antifungal, antioxidant and anti-inflammatory products, and could be used as natural additives. Moreover, the encapsulation in cyclodextrins reduce EO antifungal activity. That is why, further assays should be conducted in order to improve the quantity and quality of the EO obtained on contaminated soils, by searching the appropriate AMF species and oregano variety. This will contribute to the safe valorization of the contaminated biomass by producing EO-based biocide to fight against plant pathogens.

Acknowledgements

The authors wish to thank the “Association de Spécialisation et d’Orientation Scientifique” for providing financial supports for Mr. I. El-Alam.

References

- Abarca, R.L., Rodríguez, F.J., Guarda, A., Galotto, M.J., Bruna, J.E., 2016. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. Food Chem. 196, 968–975. doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.023
- Abrahams, P.W., 2002. Soils: their implications to human health. Sci. Total Environ. 291, 1–32. doi:10.1016/s0048-9697(01)01102-0
- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 6, 671–672.
- Agnello, A.C., Bagard, M., van Hullebusch, E.D., Esposito, G., Huguenot, D., 2016.

- Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Sci. Total Environ.* 563–564, 693–703.
- Alagić, S.Č., Maluckov, B.S., Radojičić, V.B., 2015. How can plants manage polycyclic aromatic hydrocarbons? May these effects represent a useful tool for an effective soil remediation? A review. *Clean Technol. Environ. Policy* 17, 597–614. doi:10.1007/s10098-014-0840-6
- Alarcón, A., Davies, F., Autenrieth, R., Zuberer, D., 2008. Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Int. J. Phytoremediation* 10, 251–263.
- Angelova, V.R., Perifanova-Nemska, M.N., Uzunova, G.P., Ivanov, K. i., Lee, H.Q., 2016. Potential of sunflower for phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. *Int. J. Biol. Biomol. Agric. Food Biotechnol. Eng.* 10, 551–558.
- Asgari Lajayer, B., Ghorbanpour, M., Nikabadi, S., 2017. Heavy metals in contaminated environment: Destiny of secondary metabolite biosynthesis, oxidative status and phytoextraction in medicinal plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145, 377–390. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.07.035
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- Ben Hsouna, A., Hamdi, N., Ben Halima, N., Abdelkafi, S., 2013. Characterization of essential oil from *Citrus aurantium* L. flowers: antimicrobial and antioxidant activities. *J. Oleo Sci.* 62, 763–772. doi:10.5650/jos.62.763
- Berka-Zougali, B., Ferhat, M.A., Hassani, A., Chemat, F., Allaf, K.S., 2012. Comparative study of essential oils extracted from Algerian *myrtus communis* L. leaves using microwaves and hydrodistillation. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 4673–4695. doi:10.3390/ijms13044673
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Chen, W., Li, J., Sun, X., Min, J., Hu, X., 2017. High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium *Dietzia* species CN-3. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 118, 110–118. doi:10.1016/j.ibiod.2017.01.029
- Copetta, A., Lingua, G., Berta, G., 2006. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. Genovese. *Mycorrhiza* 485–494.
- Daouk, R., Dagher, S., 1995. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *J. Food Prot.* 58.
- Davies, N.W., 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *J. Chromatogr. A* 503, 1–24.
- De Falco, E., Mancini, E., Roscigno, G., Mignola, E., Taglialatela-Scafati, O., Senatore, F.,

2013. Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* L. under Different Growth Conditions. *Molecules* 18, 14948–14960. doi:10.3390/molecules181214948
- Degerli, S., Tepe, B., Celiksoz, A., Berk, S., Malatyali, E., 2012. In vitro amoebicidal activity of *Origanum syriacum* and *Origanum laevigatum* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Exp. Parasitol.* 131, 20–24. doi:10.1016/j.exppara.2012.02.020
- Dorantes, A.R., Angélica, L., Zúñiga, G., 2012. Phenoloxidases activity in root system and their importance in the phytoremediation of organic contaminants. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* 4, 35–40. doi:10.5897/JECE11.012x
- El-Fadel, M., Maroun, R., Bsar, R., Makki, M., Reiss, P., Rothberg, D., 2003. Water Quality Assessment of the Upper Litani River Basin and The Lake Qaraoun Lebanon.
- El-Shatnawi, M.K.J., Makhadmeh, I.M., 2001. Ecophysiology of the plant-rhizosphere system. *J. Agron. Crop Sci.* 187, 1–9.
- Europe, C. of, 1997. *European Pharmacopoeia*, 3rd ed. Strasbourg.
- Gendy, A.N. El, Leonardi, M., Mugnaini, L., Bertelloni, F., Ebani, V. V., Nardoni, S., Mancianti, F., Hendawy, S., Omer, E., Pistelli, L., 2015. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild and cultivated *Origanum syriacum* plants grown in Sinai, Egypt. *Ind. Crops Prod.* 67, 201207. doi:10.1016/j.indcrop.2015.01.038
- Gerhardt, K.E., Huang, X.-D., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Sci.* 176, 20–30. doi:10.1016/j.plantsci.2008.09.014
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1–15. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.03.137
- Hart, M.M., Forsythe, J.A., 2012. Using arbuscular mycorrhizal fungi to improve the nutrient quality of crops; nutritional benefits in addition to phosphorus. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 148, 206–214. doi:10.1016/j.scienta.2012.09.018
- Hassan, S.E.-D., Boon, E., St-Arnaud, M., Hijri, M., 2011. Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils. *Mol. Ecol.* 20, 3469–3483. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05142.x
- Hassiotis, C.N., Ntana, F., Lazari, D.M., Poullos, S., Vlachonasios, K.E., 2014. Environmental and developmental factors affect essential oil production and quality of *Lavandula angustifolia* during flowering period. *Ind. Crops Prod.* 62, 359–366. doi:10.1016/j.indcrop.2014.08.048
- Huang, Y., Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Gong, Y., Chen, X., Guo, Z., Wang, Q., Jiang, W., 2010. Antifungal activity of the essential oil of *Illicium verum* fruit and its main component trans-anethole. *Molecules* 15, 7558–7569. doi:10.3390/molecules15117558
- Ibrahim, L., Karaky, M., Ayoub, P., El Ajouz, N., Ibrahim, S., 2012. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil and its components from Lebanese *Origanum syriacum* L. *J. Essent. Oil Res.* 24, 339–345. doi:10.1080/10412905.2012.692900
- Iffis, B., St-Arnaud, M., Hijri, M., 2014. Bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungi within roots of plants growing in a soil highly contaminated with aliphatic and aromatic petroleum hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Lett.* 358, 44–54.
- Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., Bartlam, M., 2013. Structural insights into diversity and n-alkane

- biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Front. Microbiol.* 4, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2013.00058
- Joner, E.J., Leyval, C., 2003. Rhizosphere Gradients of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Dissipation in Two Industrial Soils and the Impact of Arbuscular Mycorrhiza. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2371–2375. doi:10.1021/es020196y
- Kfoury, M., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Bourdon, N., Laruelle, F., Fontaine, J., Auezova, L., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S., 2016. Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. *Food Chem.* 196, 518–525. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.078
- Khaosaad, T., Vierheilig, H., Nell, M., Zitterl-Eglseer, K., Novak, J., 2006. Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza* 16, 443–446. doi:10.1007/s00572-006-0062-9
- Khobragade, C.N., Bhande, R.M., 2012. In vitro antibacterial, membrane damage, antioxidant and antiinflammatory activities of *Barleria prionitis* L extract on UTI causing multidrug resistant *E. coli*. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 4, 64–69.
- Kohl, S.M., Klein, M.S., Hochrein, J., Oefner, P.J., Spang, R., Gronwald, W., 2012. State-of-the art data normalization methods improve NMR-based metabolomic analysis. *Metabolomics* 8, 146–160.
- Kumar, A.D.N., Bevara, G.B., Laxmikoteswamma, K., RR, M., 2013. Antioxidant, cytoprotective and antiinflammatory activities of stem bark extract of *Semecarpus Anacardium*. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 6, 0–6.
- Lal, K., Yadav, R.K., Kaur, R., Bundela, D.S., Khan, M.I., Chaudhary, M., Meena, R.L., Dar, S.R., Singh, G., 2013. Productivity , essential oil yield , and heavy metal accumulation in lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) under varied wastewater – groundwater irrigation regimes. *Ind. Crop. Prod.* 45, 270–278. doi:10.1016/j.indcrop.2013.01.004
- Lenoir, I., Fontaine, J., Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2016a. 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., 2016b. 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
- Loizzo, M.R., Menichini, F., Conforti, F., Tundis, R., Bonesi, M., Saab, A.M., Statti, G.A., Cindio, B. de, Houghton, P.J., Menichini, F., Frega, N.G., 2009. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chem.* 117, 174–180. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.095
- Marzoug, H.N. Ben, Romdhane, M., Lebrihi, A., Lebrihi, F., Couderc, F., Abderraba, M., Abderraba, M.L., Bouajila, J., 2011. Eucalyptus oleosa essential oils: Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the oils from different plant parts (stems, leaves, flowers and fruits). *Molecules* 16, 1695–1709. doi:10.3390/molecules16021695
- Mizushima, Y., Kobayashi, M., 1968. Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *J. Pharm. Pharmacol.* 20,

- 169–173. doi:10.1111/j.2042-7158.1968.tb09718.x
- Mohammadi, S., Aroiee, H., Aminifard, M.H., Jahanbakhsh, V., 2012. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against strawberry grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 45, 2474–2484. doi:10.1080/03235408.2012.729422
- Mouterde, P., 1983. *Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie*. Tome III. Editions de l'Imprimerie catholique.
- Nehme, N., Haydar, C., Koubaissy, B., Fakih, M., Awad, S., Toufaily, J., Villieras, F., Hamieh, T., 2014. The Distribution of Heavy Metals in the Lower River Basin, Lebanon. *Phys. Procedia* 55, 456–463. doi:10.1016/j.phpro.2014.07.066
- Nwoko, C.O., 2014. Effect of Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi on the Physiological Performance of *Phaseolus vulgaris* Grown under Crude Oil Contaminated Soil. *J. Geosci. Environ. Prot.* 2, 9–14. doi:10.4236/gep.2014.24002
- Pandey, V.C., Pandey, D.N., Singh, N., 2015. Sustainable phytoremediation based on naturally colonizing and economically valuable plants. *J. Clean. Prod.* 86, 37–39. doi:10.1016/j.jclepro.2014.08.030
- Patel, R.P., Singh, R., Rao, B.R.R., Singh, R.R., Srivastava, A., Lal, R.K., 2016. Differential response of genotype × environment on phenology, essential oil yield and quality of natural aroma chemicals of five *Ocimum* species. *Ind. Crops Prod.* 87, 210–217. doi:10.1016/j.indcrop.2016.04.001
- Quiroga, E.N., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A., 2001. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 74, 89–96. doi:10.1016/S0378-8741(00)00350-0
- Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., Banat, I.M., 2003. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour. Technol.* 90, 159–168. doi:10.1016/S0960-8524(03)00114-7
- Ramadass, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., 2016. Soil bacterial strains with heavy metal resistance and high potential in degrading diesel oil and n-alkanes. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 13, 2863–2874. doi:https://doi.org/10.1007/s13762-016-1113-1
- Rojo, F., 2009. Degradation of alkanes by bacteria: Minireview. *Environ. Microbiol.* 11, 2477–2490. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x
- Rydlová, J., Jelínková, M., Dušek, K., Dušková, E., Vosátka, M., Püschel, D., 2016. Arbuscular mycorrhiza differentially affects synthesis of essential oils in coriander and dill. *Mycorrhiza* 26, 123–131. doi:https://doi.org/10.1007/s00572-015-0652-5
- Sakat, S.S., Juvekar, A.R., Gambhire, M.N., 2010. In-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* linn. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2, 146–155.
- Segura, A., Rodríguez-Conde, S., Ramos, C., Ramos, J.L., 2009. Bacterial responses and interactions with plants during rhizoremediation. *Microb. Biotechnol.* 2, 452–64. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00113.x
- Smith, S.E., Smith, F.A., 2011. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 227–250. doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103846

- Tarraf, W., Ruta, C., Tagarelli, A., De Cillis, F., De Mastro, G., 2017. Influence of arbuscular mycorrhizae on plant growth, essential oil production and phosphorus uptake of *Salvia officinalis* L. *Ind. Crops Prod.* 102, 144–153. doi:10.1016/j.indcrop.2017.03.010
- USAID, 2011a. Litani River Basin Management Support Program-Water Quality Survey-Dry Season Volume II-Appendices.
- USAID, 2011b. Litani River Basin Management Support Program- Water Quality Survey - Dry Season (Summer 2010).
- Verma, S.K., Singh, K., Gupta, A.K., Pandey, V.C., Trivedi, P., Verma, R.K., Patra, D.D., 2014. Aromatic grasses for phytomanagement of coal fly ash hazards. *Ecol. Eng.* 73, 425–428. doi:https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.106
- W. Jennings, T.S., 2012. *Qualitative Analysis of Flavour and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography*. Elsevier.
- Wagacha, J.M., Muthomi, J.W., 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Prot.* 26, 877–885. doi:10.1016/j.cropro.2006.09.003
- Wang, W., Shao, Z., 2013. Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation. *Front. Microbiol.* 4, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2013.00116
- Wojtera-Kwiczor, J., Żukowska, W., Graj, W., Małecka, A., Piechalak, A., Ciszewska, L., Chrzanowski, Ł., Lisiecki, P., Komorowicz, I., Barałkiewicz, D., Voss, I., Scheibe, R., Tomaszewska, B., 2014. Rhizoremediation of Diesel-Contaminated Soil with Two Rapeseed Varieties and Petroleum degraders Reveals Different Responses of the Plant Defense Mechanisms. *Int. J. Phytoremediation* 16, 770–789. doi:10.1080/15226514.2013.856848
- Wu, F.Y., Yu, X.Z., Wu, S.C., Lin, X.G., Wong, M.H., 2011. Phenanthrene and pyrene uptake by arbuscular mycorrhizal maize and their dissipation in soil. *J. Hazard. Mater.* 187, 341–347. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.01.024
- Ye, C.-L., Dai, D.-H., Hu, W.-L., 2013. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). *Food Control* 30, 48–53. doi:10.1016/j.foodcont.2012.07.033
- Yu, X.Z., Wu, S.C., Wu, F.Y., Wong, M.H., 2011. Enhanced dissipation of PAHs from soil using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. *J. Hazard. Mater.* 186, 1206–1217. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.11.116
- Zangaro, W., Rostirola, L.V., Carrenho, P.B. de S., Alves, R. de A., Lescano, L.E.A.M., Rondina, A.B.L., Nogueira, M.A., Carrenho, R., 2013. Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. *Mycorrhiza* 23, 221–233. doi:10.1007/s00572-012-0464-9
- Zeng, Y., Guo, L.-P., Chen, B.-D., Hao, Z.-P., Wang, J.-Y., Huang, L.-Q., Yang, G., Cui, X.-M., Yang, L., Wu, Z.-X., Chen, M.-L., Zhang, Y., 2013. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and active ingredients of medicinal plants: current research status and perspectives. *Mycorrhiza* 23, 253–265. doi:10.1007/s00572-013-0484-0
- Zgheib, R., Chaillou, S., Ouaini, N., Kassouf, A., Rutledge, D., El Azzi, D., El Beyrouthy, M., 2016. Chemometric tools to highlight the variability of the chemical composition and yield of Lebanese *Origanum syriacum* L. essential oil depending on harvesting time,

- geographical location and drying methods. *Chem. Biodivers.* 13, 1326–1347. doi:10.1002/cbdv.201600061
- 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. *J. Heal. Sci.* 56, 257–266. doi:10.1248/jhs.56.257
- Zheljazkov, V.D., Craker, L.E., Xing, B., 2006. Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil. *Environ. Exp. Bot.* 58, 9–16.
- Zheljazkov, V.D., Jeliaskova, E.A., Kovacheva, N., Dzhurmanski, A., 2008. Metal uptake by medicinal plant species grown in soils contaminated by a smelter 64, 207–216. doi:10.1016/j.envexpbot.2008.07.003
- Zheljazkov, V.D., Nielsen, N.E., 1996. Effect of heavy metals on peppermint and cornmint. *Plant Soil* 178, 59–66. doi:10.1007/BF00011163
- 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

Présentation de la publication 3

Les traitements de conservation appliqués aux aliments visent à préserver leur comestibilité et leurs propriétés gustatives et nutritives en empêchant le développement des microorganismes qu'ils renferment et qui peuvent dans certains cas entraîner une intoxication alimentaire. Les additifs alimentaires et les conservateurs à base de composés naturels tels que les HE extraites des plantes aromatiques constituent un moyen alternatif prometteur qui peut remplacer les produits chimiques à l'origine de diverses maladies auto-immunes et des allergies (Kralova et Sjöblom, 2009 ; Lerner et Matthias, 2015). Grâce à leur richesse en principes actifs, les HE possèdent des propriétés biologiques diverses dont les activités biocides, antioxydantes et anti-inflammatoires. En effet, différents travaux ont démontré l'efficacité des HE à inhiber le développement fongique (Ankri et Mirelman, 1999 ; Ben Hsouna et al., 2013 ; Benkeblia, 2004 ; Corzo-Martínez et al., 2007 ; Ye et al., 2013) et bactériens (Baydar et Sa, 2004 ; Ben Hsouna et al., 2013; Marzoug et al., 2011), ainsi qu'à piéger les ERO et les radicaux libres générés par l'oxydation des lipides et des protéines des aliments (Mohamed et al., 2013 ; Piao et al., 2004 ; Prakash et al., 2007 ; Reshma et al., 2014 ; Ye et al., 2013) et l'inflammation (Chippada et al., 2011 ; Govindappa et al., 2011 ; Gupta et al., 2013 ; Kumar et al., 2013 ; Miguel, 2010 ; Sakat et al., 2010).

Ainsi, cette étude vise à évaluer les activités biologiques (antifongiques, antioxydantes et anti-inflammatoires) des HE extraites de différentes espèces végétales dont l'angélique (*Angelica archangelica*) (racines et graines), la ciboulette (*Allium schoenoprasum*), le cerfeuil (*Anthriscus cerefolium*), l'ail (*Allium tuberosum*), le poireau (*Allium porum*), l'oignon (*Allium cepa*), l'échalote (*Allium ascalonicum*) et le thuya (*Thuya atrovirens*), obtenues par hydrostillisation. L'activité antifongique a été évaluée, par contact direct et par volatilité, contre le champignon phytopathogène *Fusarium culmorum*, agent phytopathogène responsable de divers maladies telles que la fonte des semis, la pourriture racinaire, la fusariose de l'épi chez les céréales et la production de métabolites secondaires toxiques pour l'Homme, les mycotoxines. Les activités biologiques de ces huiles ont été testées, en présence et en absence des cyclodextrines HP- β -CD, oligosaccharides cycliques qui

complexent les HE et augmentent leurs biodisponibilités.

Nos résultats montrent que les concentrations inhibitrices médianes (IC50) obtenues pour l'activité antifongique par contact direct varient de 0,01 à 4,2 g.L⁻¹ pour les HE extraites de l'échalote et de l'angélique racine respectivement. En effet, les IC50 augmentent progressivement suivant l'ordre : IC50 HE échalote < IC50 HE oignon < IC50 HE angélique graine < IC50 HE ciboulette < IC50 HE poireau < IC50 HE ail < IC50 HE cerfeuil < IC50 HE thuya < IC50 HE angélique racine.

D'autre part, les IC50 obtenues par volatilité sont de 1,2 à 23 fois plus importantes que celles obtenues par contact direct. Elles varient de 0,08 g.L⁻¹ pour l'HE d'échalote à 25,6 g.L⁻¹ pour l'HE de poireau suivant cet ordre : IC50 HE échalote < IC50 HE angélique graine < IC50 HE angélique racine < IC50 HE oignon < IC50 HE cerfeuil < IC50 HE thuya < IC50 HE ciboulette < IC50 HE ail < IC50 HE poireau.

Par ailleurs, les HE testées présentent des activités antioxydantes et anti-inflammatoires. Concernant l'activité antioxydante des huiles, les IC50 obtenues varient de 0,05 g.L⁻¹ à 6,7 g.L⁻¹ pour les HE extraites d'angélique graine et de thuya respectivement, selon l'ordre suivant : IC50 HE angélique graine < IC50 HE oignon < IC50 HE échalote < IC50 HE poireau < IC50 HE cerfeuil < IC50 HE ciboulette < IC50 HE ail < IC50 HE angélique racine < IC50 HE thuya. L'activité antioxydante est aussi comparée à celle obtenue avec le standard Trolox®, analogue hydrophile de la vitamine E connu pour son pouvoir anti-radicalaire et les résultats sont exprimés par TEAC (Trolox® equivalent antioxidant capacity). Les activités antioxydantes des HE d'angélique graine, oignon et d'échalote sont de 151 à 196 fois plus importantes que celle obtenues pour le Trolox, alors que celles de thuya, angélique racine, ail et ciboulette sont de 1,6 à 5 µmol Trolox/g EO.

En outre, les IC50 obtenue par l'activité anti-inflammatoire des HE varient de 0,05 g.L⁻¹ pour l'HE extraite d'angélique graine et 6,7 g.L⁻¹ pour celle extraite de thuya, selon l'ordre suivant : IC50 HE angélique graine < IC50 HE oignon < IC50 HE échalote < IC50 HE poireau < IC50 HE cerfeuil < IC50 HE ciboulette < IC50 HE ail < IC50 HE angélique racine < IC50 HE thuya. En outre, les IC50 de l'activité anti-inflammatoire varie de 0,42 g.L⁻¹ pour l'HE d'angélique graine et 52,3 g.L⁻¹ pour celle de l'ail. Cependant, l'ajout des cyclodextrines n'a pas d'influence significative sur les IC50 obtenues pour toutes les activités biologiques testées. Or, des différences en termes d'efficacité de ces HE sont remarquables. Certaines huiles dont celles extraites d'échalote, d'oignon et d'angélique graine sont plus efficaces que d'autres. Ceci pourrait être dû à l'abondance et à la composition de leurs principes actifs.

Publication 3 : Screening biological activities of essential oils: antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities

Imad El-Alam^{1,2}, A. Verdin¹, J. Fontaine¹, N. Bourdon¹, S. Fourmentin¹, R. Chahine², H. Makhlouf², A. Lounès-Hadj Sahraoui^{1*}

1: Univ Littoral Côte d'Opale, EA 4492 – UCEIV – Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, SFR Condorcet FR CNRS 3417, F-62228 Calais cedex, France.

2: Equipe Stress Oxydatif et Antioxydants, Faculté des Sciences Médicales, Campus Universitaire Hariri, Hadath, Liban.

*Corresponding author E-mail: lounes@univ-littoral.fr

Abstract:

Context: The use of natural food preservatives and drugs based on essential oils is nowadays arousing great interest. Indeed, essential oils (EO) are showing high efficiency to control food spoilage, and were interestingly shown to have efficient antioxidants and anti-inflammatory activities within human organism.

Objective: The aim of this study was to evaluate the biological activities of 9 essential oils isolated from angelica (roots and seeds), chives, chervil, garlic, leek, onion, shallots and thuya plants, in the presence and absence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD).

Materials and methods: 1) Antifungal activity by both direct contact and volatility assays against a fungal phytopathogen, *Fusarium culmorum*, 2) antioxidant properties, assessed by DPPH assay, and 3) anti-inflammatory activities, investigated via the inhibition of albumin denaturation test, were pointed out.

Results: Our results showed that the different IC₅₀ of antifungal activity obtained by direct contact assay ranged from 0.01 g.L⁻¹ for shallots EO to 4.2 g.L⁻¹ for angelica roots EO, whereas IC₅₀ found using the volatility test varied from 0.08 g.L⁻¹ for shallots up to 25.6 g.L⁻¹ for leek EO. Considering antioxidant activity, angelica seeds EO presented the highest activity (with the lowest IC₅₀: 0.05 g.L⁻¹) while the thuya EO has the lowest (6.7 g.L⁻¹). Finally, with regard to anti-inflammatory activity, IC₅₀ varied between 0.42 g.L⁻¹ for angelica seeds EO to 52.3 g.L⁻¹ for garlic EO. It is to note that the presence of HP- β -CD did not significantly improved the EO activities whatever the biological test considered.

Discussion and conclusion: Our findings evidenced that EO coming from shallots, onions and angelica seeds are of interest to regulate fungal pathogen development and to be used as antioxidant and anti-inflammatory additives.

Key words: essential oil - antifungal - antioxidant - anti-inflammatory – plant extracts

1. Introduction

Food safety from spoilers and pathogens is an important worldwide public health concern, and microbial contamination is a vital factor not only causing food deterioration and shelf life reduction, but also resulting in economic losses and diseases (da Cruz Cabral et al., 2013; Ye et al., 2013). Both in the field and during postharvest storage, fruits and vegetables are highly susceptible to fungal spoilage. Among these fungal phytopathogens, *Fusarium* genera is widely studied not only for causing plant diseases such as *Fusarium* head blight and *Fusarium* crown rot, but also for producing highly toxic secondary metabolites, mycotoxins, that lead to contamination of the grain harvested from infected ears and cause potential risk to human and animal health (Wagacha and Muthomi, 2007). On the other hand, lipid and protein oxidation in food generate free radical and/or reactive oxygen species (ROS) which may cause serious human diseases such as ageing, cancer, coronary heart disease, Alzheimer's disease, neurodegenerative disorders, atherosclerosis, cataracts and inflammation (Lushchak, 2014; Papuc et al., 2017; Raut and Karuppayil, 2014). Indeed, ROS, such as $O_2^\bullet$ (anion radical), H_2O_2 (hydrogen peroxide), $HO^\bullet$ (hydroxyl radical), are naturally generated in the human body and play the role of messengers in cellular proliferation, differentiation and apoptosis processes. ROS accumulation is regulated by antioxidant defense systems, both enzymatic (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase et peroxiredoxin) and non-enzymatic (vitamins C and E, carotenoids, flavonoids), which either prevent or scavenge ROS (Ye et al., 2015). Excessive ROS production cause imbalance between these species and their corresponding scavengers which lead to the development of an oxidative stress responsible for lipid, DNA, RNA and proteins damages. Besides, ROS production is also related to inflammation due to infection or injury. During inflammation, oxidative burst occurs in monocytes, neutrophils, eosinophils and macrophages (Miguel, 2010). Indeed, excessive activation of phagocytes leads to overproduction of ROS which can increase surrounding tissues damages due to lipid peroxidation of cell membranes and organelles (Kumar et al., 2013).

In order to protect food from pathogen contamination, lipid and protein oxidation in food due to ROS formation and inflammation in human tissues, various physical and chemical methods are used. However, chemicals based-preservatives and additives in food pose a potential risk to humans such as autoimmune diseases, allergy, reproductive toxicity, and mutagenicity (Kralova and Sjöblom, 2009; Lerner and Matthias, 2015). That's why the use of

natural compounds as food additives and preservatives such as those based on essential oils, is a promising alternative technique (da Cruz Cabral et al., 2013).

Essential oils (EO) are complex oily volatile liquids characterized by a strong odour and formed by aromatic plants as secondary metabolites. They are synthesized by all plant organs (flowers, buds, seeds, leaves, twigs, bark, herbs, wood, fruits and root) and are stored in secretory cells, cavities, canals, epidermic cells or glandular trichomes (Miguel, 2010). Essential oils are widely used for bactericidal, virucidal, fungicidal, antiparasitical, insecticidal, medicinal applications, sanitary, and food industries (Bakkali et al., 2008). Nevertheless, EO possess low aqueous solubility and bioavailability, hence the interest of the encapsulation in cyclodextrins. Indeed, these cyclic oligosaccharides have a hydrophilic surface and hydrophobic cavity that allow them to encapsulate EO and form inclusion complexes, which enhance their aqueous solubility and stability and maintain their bioactivity (Kfoury et al., 2016).

Thus, the present study aims to evaluate a natural alternative, the essential oil-based compounds, to counteract fungal phytopathogen as well as their antioxidant and anti-inflammatory potential activities. That's why, biological activities of several EO extracted by hydrodistillation process from different plant species [angelica (roots and seeds), chives, chervil, garlic, leek, onion, shallots and thuya], were assessed.

2. Materials and Methods

2.1. Essential Oils materials

Essential oils tested in the current study were provided by FERRANT PHE (France), an EO producer company. Tested EO were isolated from angelica (*Angelica archangelica*) (roots and seeds), chives (*Allium schoenoprasum*), chervil (*Anthriscus cerefolium*), garlic (*Allium tuberosum*), leek (*Allium porum*), onion (*Allium cepa*), shallots (*Allium ascalonicum*) and thuya (*Thuya atrovirens*) by hydrodistillation process.

2.2. Biological activities of EO extracts

2.2.1. Antifungal activity of EO extracts

Antifungal activities of the different EO, were tested against *Fusarium culmorum* by using two in vitro methods: direct contact (mycelial radial growth inhibition assay) and volatility assays.

- Direct contact assay: antifungal activity by direct contact was assessed according to Huang et al. (2010) and Quiroga et al. (2001) followed with minor modifications. Mycelial discs of *F. culmorum* (0.9 cm) from the edge of a 7-day-old culture fungal colony, were cut and placed at the center of a 9 cm Petri dish containing potato dextrose agar (PDA) culture medium (40 g.L⁻¹). Essential oils were mixed with PDA medium at 50 °C in order to obtain final concentrations ranged from 0.02 % to 2.5 % of EO in the medium. These latter were previously sterilized by filtration and prepared in ethanolic solution 1 %. Direct contact assay was performed in the absence and the presence of HP-β-CD at final concentration 10 mM in the medium. Analyses were led in triplicates. Samples were incubated for 7 days at 20 °C, and subsequently the radius of mycelium growth was measured. Inhibition rate was calculated following the formula:

$$\text{Percentage of mycelial growth inhibition} = (X_0 - X_i) / X_0 * 100$$

where X_0 =Average diameter of the fungal colony in control; X_i =Average diameter of the fungal colony in treatment.

Graphical interpolation analysis was used to calculate the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value.

- Volatility assay: antifungal activity by volatility was assessed according to Abarca et al. (2016) followed with minor modifications. Mycelial discs of *F. culmorum* (0.9 cm) from the edge of a 7-day-old culture fungal colony were cut and placed at the center of a 5.5 cm Petri dish culture medium plate with PDA. This plate was stuck with PDA into a 9 cm Petri dish that contained EO solutions. These latter were previously sterilized by filtration and prepared in both ethanolic solution and HP-β-CD (10 mM). EO concentrations used ranged from 0.01 % to 5 %. Analyses were led in triplicates.

Samples were incubated for 5 days at 20 °C, and subsequently the radius of mycelium growth was measured. Inhibition rate was calculated as follow:

$$\text{Percentage of mycelial growth inhibition} = (X_0 - X_i) / X_0 * 100$$

where X_0 =Average diameter of the fungal colony in control; X_i =Average diameter of the fungal colony in treatment.

Graphical interpolation analysis was used to calculate the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value.

2.2.2. Antioxidant activity of EO extracts

Antioxidant activity was assessed using the free radical, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) assay, as proposed by Brand-Williams et al. (1995), with slight modifications. Concentration ranges of EO (up to 25000 ppm) were prepared in ethanol. 0.2 mL of each EO concentration was dissolved in 2 mL of water or 2 mL of HP-β-CD (10 mM). Mixtures were vigorously mixed with 2 mL of ethanolic DPPH[•] solution (0.1 mM) and were shaken for 1 h at 25 °C in the dark. The experiment was performed in triplicates. The absorbance was measured at 517 nm. The antioxidant activity was calculated as follows:

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = (A_0 - A_i) / A_0 * 100$$

where A_i and A_0 are the absorbance of sample and blank samples respectively.

The antioxidant activities were compared to that of the Trolox® standard (a vitamin E analog known for its antioxidant activity). The results were expressed in terms of Trolox® equivalent antioxidant capacity (TEAC) (μMol trolox/ g EO), by using a Trolox calibration curve prepared for a concentration range of 0.94-3.75 μM. Graphical interpolation analysis was used to calculate the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value.

2.2.3. Anti-inflammatory activity of EO extracts

Anti-inflammatory activity of EO was evaluated using the inhibition of albumin denaturation technique according to Mizushima and Kobayashi (1968) and Sakat et al. (2010) with minor modifications. A range of EO volumes (up to 150 μL) was added to 1 mL of bovine albumin serum (BSA) (0.2 % aqueous solution, pH adjusted at 6.8). This assay was performed in the absence and presence of HP-β-CD (10 mM) where EO were previously mixed with their double volume of HP-β-CD. Samples were incubated at 37 °C for 20 min

and then heated at 72 °C for 20 min. After cooling the samples, the turbidity was measured spectrophotometrically at 660 nm. The experiment was led in triplicates. Percent inhibition of albumin denaturation was calculated using the following equation:

$$\text{Inhibition rate} = (1 - (A_i - A_x)/A_0) * 100$$

where A_i and A_x are the absorbances of the sample and its positive control respectively; A_0 is the absorbance of the blank sample.

Graphical interpolation analysis was used to calculate the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value.

3. Statistical analysis

All extractions and experiments were performed in triplicates. In order to determine significant differences between the means of antifungal (both direct contact and volatility assays), antioxidant and anti-inflammatory activities assays of EO extracts in the presence and the absence of HP- β -CD, ANCOVA test ($p < 0.05$) was done using XLSTAT.

4. Results

4.1. Antifungal activity of EO extracts

The results showed that all the tested EO presented antifungal properties against *F. culmorum* both by direct contact and by volatility assays.

- Direct contact assay: IC₅₀ obtained by direct contact varied from 0.01 to 4.2 g.L⁻¹ for shallots EO and angelica roots EO respectively. Indeed, IC₅₀ were gradually increased in the following order: IC₅₀ shallots EO < IC₅₀ onion EO < IC₅₀ angelica seeds EO < IC₅₀ chives EO < IC₅₀ leek EO < IC₅₀ garlic EO < IC₅₀ chervil EO < IC₅₀ thuya EO < IC₅₀ angelica roots EO. On the other hand, no significant differences were observed between the IC₅₀ obtained in the presence and the absence of HP- β -CD. In the presence of cyclodextrins, shallots EO presented the lowest IC₅₀ (0.03 g.L⁻¹) and angelica roots EO the highest (5.8 g.L⁻¹). IC₅₀ were gradually increased as follow: IC₅₀ shallots EO < IC₅₀ onion EO < IC₅₀ angelica seeds EO < IC₅₀ chives EO < IC₅₀ garlic EO < IC₅₀ leek EO < IC₅₀ chervil EO < IC₅₀ thuya EO < IC₅₀ angelica roots EO. (Table 1 and Figure 1)

- Volatility assay: the IC₅₀ obtained by volatility assay ranged from 0.08 g.L⁻¹ for shallots EO to 25.6 g.L⁻¹ for leek EO. IC₅₀ were gradually increased in the following order: IC₅₀ shallots EO < IC₅₀ angelica seeds EO < IC₅₀ angelica roots EO < IC₅₀ onion EO < IC₅₀ chervil EO < IC₅₀ thuya EO < IC₅₀ chives EO < IC₅₀ garlic EO < IC₅₀ leek EO. Once again, HP- β -CD did not show any beneficial effect on obtained IC₅₀. IC₅₀ obtained by volatility assay, in the presence of HP- β -CD, ranged from 0.09 to 7.3 g.L⁻¹ for shallots and angelica roots EO respectively. IC₅₀ were increased as following order: IC₅₀ shallots EO < IC₅₀ angelica seeds EO < IC₅₀ onion EO < IC₅₀ chives EO < IC₅₀ garlic EO < IC₅₀ thuya EO < IC₅₀ leek EO < IC₅₀ chervil EO < IC₅₀ angelica roots EO (Table 2 and Figure 2).

Table 1: IC₅₀ of antifungal activity of EO obtained by direct contact assay

IC ₅₀ (g.L ⁻¹) without HP- β -CD		IC ₅₀ (g.L ⁻¹) with HP- β -CD	
Shallots	0.01 ^a	Shallots	0.03 ^a
Onion	0.1 ^a	Onion	0.2 ^a
A. seeds	0.3 ^a	A. seeds	0.2 ^a
Chives	0.9 ^a	Chives	0.3 ^a
Leek	1.2 ^a	Garlic	0.4 ^a
Garlic	1.6 ^a	Leek	0.6 ^a
Chervil	3.1 ^a	Chervil	1.9 ^a
Thuya	3.6 ^a	Thuya	3.7 ^a
A. roots	4.2 ^a	A. roots	5.8 ^a

IC₅₀: inhibitory concentration; a, b: significant difference between results obtained in presence of CD in comparison with those obtained in free-HP- β -CD treatment (p<0.05).

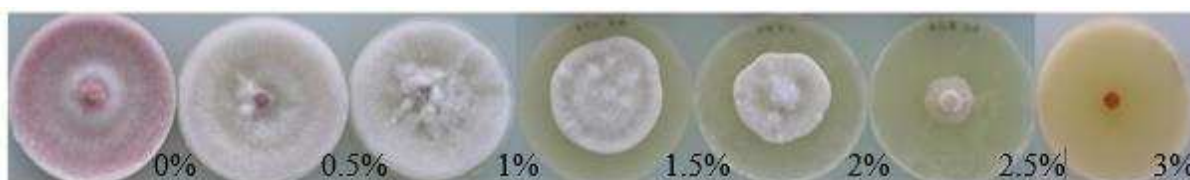


Figure 1: Antifungal activity of Angelica seeds EO obtained by direct contact assay in the absence of cyclodextrins.

EO concentrations were, from left to right, 0 - 0.5 - 1 - 1.5 - 2 - 2.5 and 3 %. Inhibition rates were 0 - 12 - 28 - 54 - 56 - 72 and 100 % respectively.

Table 2: IC₅₀ of antifungal activity of EO obtained by volatility assay

IC ₅₀ (g.L ⁻¹) without CD		IC ₅₀ (g.L ⁻¹) with CD	
Shallots	0.08 ^a	Shallots	0.09 ^a
A. seeds	0.8 ^a	A. seeds	0.7 ^a
A. roots	2.2 ^a	Onion	1.4 ^a
Onion	2.3 ^a	Chives	2.4 ^a
Chervil	5.5 ^a	Garlic	3.2 ^a
Thuya	9.5 ^a	Thuya	3.6 ^a
Chives	16.9 ^a	Leek	4.4 ^a
Garlic	22.6 ^a	Chervil	6.7 ^a
Leek	25.6 ^a	A. roots	7.3 ^a

IC₅₀: inhibitory concentration; CD: HP- β -CD; a, b: significant difference between results obtained in presence of CD in comparison with those obtained in free-HP- β -CD treatment ($p < 0.05$).

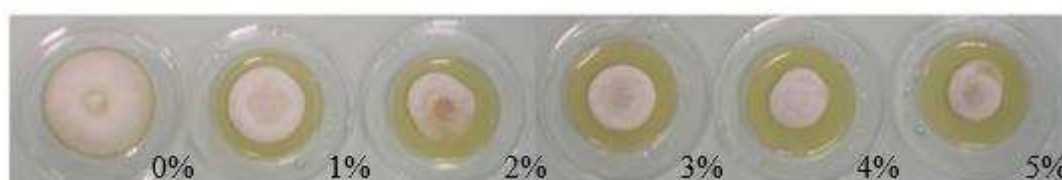


Figure 2: Antifungal activity of Angelica seeds EO obtained by volatility assay in the absence of cyclodextrins

EO concentrations were, from left to right, 0 - 1 - 2 - 3 - 4 - and 5 %. Inhibition rates were 0 -25 -32 - 41 -62 - 63 %.

4.2. Antioxidant activity of EO extracts

The results of DPPH free radical scavenging ability of the different tested EO are shown in Table 3 and expressed by the inhibitory concentration IC₅₀ and in terms of TEAC. In the absence of HP- β -CD, IC₅₀ of EO antioxidant activity assay varied from 0.05 g.L⁻¹ for angelica seeds EO and 6.7 g.L⁻¹ for thuya EO, with respect to the following order: IC₅₀ angelica seeds EO < IC₅₀ onion EO < IC₅₀ shallots EO < IC₅₀ leek EO < IC₅₀ chervil EO < IC₅₀ chives EO < IC₅₀ garlic EO < IC₅₀ angelica roots EO < IC₅₀ thuya EO. Their efficiency effectiveness was also compared to a well-known antioxidant standard, Trolox®, and expressed in terms of TEAC. The results showed that angelica seeds, onion and shallots EO were excellent antioxidants: their antioxidant activities were 151 up to 196-fold higher in comparison to that obtained by the Trolox standard. While, thuya, angelica roots, garlic and chives EO were the least effective with only 1.6 up to 5 μ mol Trolox/g EO.

No significant differences were obtained with the addition of HP- β -CD. The IC₅₀ varied from 0.07 g.L⁻¹ for onion EO to 5.89 g.L⁻¹ for thuya EO, for antioxidant activity as the following order IC₅₀ angelica seeds EO < IC₅₀ onion EO < IC₅₀ shallots EO < IC₅₀ leek EO < IC₅₀ chervil EO < IC₅₀ chives EO < IC₅₀ garlic EO < IC₅₀ angelica roots EO < IC₅₀ thuya EO. In terms of Trolox, onion EO was the most effective EO with 133 μ mol Trolox/ g EO while thuya EO was the least effective EO with 1.3 μ mol Trolox/g EO (Table 3).

Table 3: IC₅₀ of antioxidant activity of EO

Without CD			With CD		
	TEAC (μ Mol Trolox/ g EO)	IC ₅₀ (g.L ⁻¹)		TEAC (μ Mol Trolox/ g EO)	IC ₅₀ (g.L ⁻¹)
Trolox		10.87	Trolox		9.89
Angelica seeds	196.33	0.05 ^a	Onion	133.67	0.07 ^a
Onion	153.33	0.06 ^a	Angelica seeds	125.67	0.07 ^a
Shallots	151.33	0.06 ^a	Shallots	79.67	0.11 ^a
Leek	64.33	0.16 ^a	Leek	56.33	0.15 ^a
Chervil	10	1.01 ^a	Chervil	9.33	0.94 ^a
Chives	5.33	1.81 ^a	Chives	6.00	1.48 ^a
Garlic	3	3.16 ^a	Garlic	2.33	3.63 ^a
Angelica roots	2	5.51 ^a	Angelica roots	2	3.98 ^a
Thuya	1.67	6.70 ^a	Thuya	1.33	5.89 ^a

IC₅₀: inhibitory concentration; CD: HP- β -CD; a, b: significant difference between results obtained in presence of CD in comparison with those obtained to free-HP- β -CD treatment (p<0.05).

4.3. Anti-inflammatory activity of EO extracts

Table 4 summarizes the IC₅₀ results obtained for the anti-inflammatory activity of EO. The inhibitory concentration IC₅₀ ranged from 0.42 g.L⁻¹ for angelica seeds EO and 52.3 g.L⁻¹ for garlic EO. Some EO were more effective than others such as angelica (roots and seeds) and shallots EO which presented lowest IC₅₀. IC₅₀ were gradually increased in the following order: IC₅₀ angelica seeds EO < IC₅₀ shallots EO < IC₅₀ angelica roots EO < IC₅₀ thuya EO < IC₅₀ chives EO < IC₅₀ leek EO < IC₅₀ onion EO < IC₅₀ chervil EO < IC₅₀ garlic EO. Once more, no significant differences were observed for the anti-inflammatory activity of tested EO in the presence of HP-β-CD where IC₅₀ varied from 0.48 g.L⁻¹ for angelica seeds EO to 53.6 g.L⁻¹ for garlic EO. IC₅₀ were gradually increase as follow: IC₅₀ angelica seeds EO < IC₅₀ shallots EO < IC₅₀ angelica roots EO < IC₅₀ leek EO < IC₅₀ thuya EO < IC₅₀ chives EO < IC₅₀ onion EO < IC₅₀ chervil EO < IC₅₀ garlic EO (Table 4).

Table 4: IC₅₀ of anti-inflammatory activity of EO

IC ₅₀ (g.L ⁻¹) Without CD		IC ₅₀ (g.L ⁻¹) With CD	
Angelica seeds	0.42 ^a	Angelica seeds	0.48 ^a
Shallots	4.3 ^a	Shallots	3.9 ^a
Angelica roots	8.2 ^a	Angelica roots	12.5 ^a
Thuya	21.8 ^a	Leek	23.4 ^a
Chives	22.17 ^a	Thuya	24.4 ^a
Leek	22.18 ^a	Chives	26.02 ^a
Onion	34.4 ^a	Onion	36.9 ^a
Chervil	39.8 ^a	Chervil	43.9 ^b
Garlic	52.3 ^a	Garlic	53.6 ^a

IC₅₀: inhibitory concentration; CD: HP-β-CD; a, b: significant difference between results obtained in presence of CD in comparison with those obtained in free-HP-β-CD treatment (p<0.05).

5. Discussion

Preservation of food materials from degradation during production, storage and marketing against pathogenic and spoilage microorganisms is an important issue due to increasing food-borne diseases that pose a considerable threat to human health. Food additives and preservatives based on natural compounds such as essential oils are promising alternative tools to replace chemical ones.

Results presented herein, based on in vitro antifungal activity against *Fusarium culmorum*, by both direct contact and volatility assays, showed that all tested EO are able to inhibit the growth of this phytopathogenic fungus, with higher efficiency for the direct contact method. Indeed, the inhibitory concentrations obtained by direct contact assay were significantly lower in comparison to those obtained with the volatility assay. Indeed, IC₅₀ obtained by volatility assay were ranging from 1.2 up to 23-fold higher than those obtained by direct contact assay. However, the efficiency of this kind of inhibition was strongly related to the type of EO used. By direct contact assay, IC₅₀ varied from 0.01 to 4.2 g.L⁻¹ for shallots and angelica roots EO respectively. Whilst, IC₅₀ obtained by volatility were higher and ranged from 0.08 g.L⁻¹ for shallots EO and 25.6 g.L⁻¹ for leek EO. Onion and garlic EO were previously studied for their antifungal activity toward *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium cyclopium*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albican*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula glutinis*, *Monascus purpureus* (Ankri and Mirelman, 1999; Benkeblia, 2004; Corzo-Martínez et al., 2007; Ye et al., 2013). Whereas, scarce are the studies that evaluate antifungal activities of tested EO by both direct contact and volatility assays, against *F. culmorum*. Indeed, EO may play a role in inhibiting fungal cell wall formation, disturbing cell membrane and fungal mitochondria function, as well as inhibiting cell proliferation, and RNA, RNA and proteins synthesis (Lagrouh et al., 2017). These mechanisms of action are principally due to their major active principles such as terpenes (carvone, limonene), and phenolic compounds (eugenol, apiol) (Lagrouh et al., 2017).

Besides antifungal properties, tested EO revealed antioxidant and anti-inflammatory activities. Regarding antioxidant activity, all tested EO did not possess the same efficiency: the IC₅₀ varied from 0.05 g.L⁻¹ for angelica seeds EO and 6.7 g.L⁻¹ for thuya EO. These results are in accordance with the range of IC₅₀ found in literature where IC₅₀ varied from 0.001 to 1.5 g.L⁻¹ depending on EO analyzed (Ben Hsouna et al., 2013; Berka-Zougali et al., 2012; Marzoug et al., 2011; Ye et al., 2013). These antioxidant activities were also compared to a well-known antioxidant standard, Trolox®, and expressed in terms of TEAC. The results

showed that angelica seeds, onion and shallots EO were excellent antioxidants: their antioxidant activities were 151 up to 196-fold higher in comparison to that obtained by the Trolox standard. However, thuya, angelica roots, garlic and chives EO were less effective with only 1.6 up to 5 μmol Trolox/ g EO. These findings showed that all tested EO could be of interest to prevent lipid oxidation in foods and ROS generation into the human body that may be detrimental to human well-being (Brand-Williams et al., 1995). Indeed, natural antioxidants, as EO, act such as physical barriers against ROS generation and/or access to biological sites, bind/inactivate metal ions in order to prevent their formation, adsorb energy and electron that neutralize ROS, and scavenge or destroy ROS (Miguel, 2010).

In addition to the ability of the different EO to scavenge free radicals, their anti-inflammatory activity was also studied. Results showed that all EO were effective in inhibiting heat induced albumin denaturation, the main cause of inflammation. Indeed, the inhibitory concentration IC₅₀ of anti-inflammatory assay ranged from 0.42 g.L⁻¹ for angelica seeds EO and 52.3 g.L⁻¹ for garlic EO. Some EO were more effective than others such as angelica (roots and seeds) and shallots EO which presented lowest IC₅₀. These results exceeded those found in the literature (0.07 up to 0.4 g.L⁻¹) (Khobragade and Bhande, 2012; Kumar et al., 2013; Sakat et al., 2010). Anti-inflammatory activities of EO are mainly attributed to their capacity to interact with signalling cascades and pro-inflammatory genes expression as detailed by Miguel (2010).

As presented above, all EO were efficient regarding to the whole biological activities assessed. Nevertheless, some EO such as those coming from shallots, onions and angelica seeds presented very high efficiency for all biological activities assessed since lower concentrations was required for obtaining a total fungal inhibition, free radical scavenging and protein denaturation assays. This may be referred to the difference in the nature and the abundance of major active principles of EO. Indeed, EO tested in this study may be divided into 3 subgroups referring to their composition: organosulfur-containing compounds (chives, garlic, leek, onion and shallots), terpene-containing compounds (angelica (roots and seeds) and thuya) and phenylpropanoids-containing compounds (chervil). The different rates of efficiency among EO of the same subgroup could be due to the abundance of major compounds: for example, shallots EO and onion EO are respectively composed at dipropyl disulphide (14.3% and 19.4%), dipropyl trisulfide (9.7% and 12.1%), dipropyl tetrasulfide (3.5% and 5.8%), methyl propyl disulfide (3.5% and 1.2%), allyl propyl disulfide (0.5% and 0.3%), methyl propyl trisulfide (8.2% and 2.7%), propen-1-yl propyle disulfide (4.4% and 7.3%), cis-propen-1-yl propyle trisulfide (2.7% and 3.2%), trans-propen-1-yl propyle

trisulfide (3.5% and 4.1%), dimethyl thiophene (0.3% and 0.06%) (source: FERRANT PHE). These findings were in agreement with the literature where it has been proved that EO are rich in potentially bioactive compounds known to have antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities such as terpens, phenylpropanes, alkaloids, flavonoids, isoflavonoids, tannins, coumarins, glycosides, and organic acids (da Cruz Cabral et al., 2013; Miguel, 2010; Naidu, 2000).

On the other hand, the encapsulation of EO in cyclodextrins (HP- β -CD) did not provide significant difference of IC₅₀ of EO at all biological activities with respect to free-HP- β -CD treatment. In the presence of HP- β -CD, the IC₅₀ of antifungal activity by direct contact assay varied from 0.03 g.L⁻¹ for shallots EO to 5.8 g.L⁻¹ for angelica roots EO, while IC₅₀ ranged from 0.09 to 7.3 g.L⁻¹ for shallots EO and angelica roots EO respectively by volatility assay. In the same way, the IC₅₀ varied from 0.07 g.L⁻¹ for onion EO to 5.89 g.L⁻¹ for thuya EO, for antioxidant activity. Besides, IC₅₀ varied from 0.48 g.L⁻¹ for angelica seeds EO to 53.6 g.L⁻¹ for garlic EO, for anti-inflammatory activity of EO.

6. Conclusion

Finally, it was concluded from the results of this investigation that essential oils extracts especially those extracted from shallots, onions and angelica seeds possess antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities, with no significant differences were obtained with encapsulated EO in cyclodextrins (HP- β -CD). Indeed, these EO presented great interest to control *Fusarium culmorum* growth by both direct contact and volatility assays. Such in vitro tests give an indication of the potential role of EO used as biopesticide to control phytopathogen infection. Further in planta assays, using individual or combined EO, should be conducted to validate EO-based biopesticides efficiency to fight against *F. culmorum* (Isman, 2000).

Besides, these EO showed great results at DPPH free radical scavenging ability. Although DPPH assay is the most commonly used assay to evaluate antioxidant activity for its simplicity and high sensitivity, additional tests such as ferric reducing/antioxidant power (FRAP) and ABTS [2,2-Azinobis(3-ethylbenzo- thiazoline-6 sulphonate)] assays are recommended in order to establish authenticity for the determination of antioxidant activity (Miguel, 2010; Ye et al., 2013). On the other hand, EO were effective in inhibiting heat induced albumin denaturation. Additionally tests are highly recommended to assess anti-inflammatory activity of EO such as proteinase inhibitory activity, membrane stabilization

and heat induced hemolysis (Chippada et al., 2011; Kumar et al., 2013; Sakat et al., 2010). Even if this effectiveness was strongly related to the essential oil used and its composition, all EO tested in the current study could potentially be used as natural and eco-friendly food additives and preservatives

Acknowledgements:

The authors wish to thank the “Association de Spécialisation et d’Orientation Scientifique” for providing financial supports for Mr I. El-Alam, and FERRANT PHE (France) for providing essential oils samples.

References:

- Abarca, R.L., Rodríguez, F.J., Guarda, A., Galotto, M.J., Bruna, J.E., 2016. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chem.* 196, 968–975. doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.023
- Ankri, S., Mirelman, D., 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* 1, 125–129. doi:10.1016/S1286-4579(99)80003-3
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- Ben Hsouna, A., Hamdi, N., Ben Halima, N., Abdelkafi, S., 2013. Characterization of essential oil from *Citrus aurantium* L. flowers: antimicrobial and antioxidant activities. *J. Oleo Sci.* 62, 763–772. doi:10.5650/jos.62.763
- Benkeblia, N., 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT - Food Sci. Technol.* 37, 263–268. doi:10.1016/j.lwt.2003.09.001
- Berka-Zougali, B., Ferhat, M.A., Hassani, A., Chemat, F., Allaf, K.S., 2012. Comparative study of essential oils extracted from Algerian *myrtus communis* L. leaves using microwaves and hydrodistillation. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 4673–4695. doi:10.3390/ijms13044673
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Chippada, S.C., Volluri, S.S., Bammidi, S.R., Vangalapati, M., 2011. In vitro anti inflammatory activity of methanolic extract of *centella asiatica* by HRBC membrane stabilisation. *Rasayan J. Chem.* 4, 457–460.
- Corzo-Martínez, M., Corzo, N., Villamiel, M., 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 609–625. doi:10.1016/j.tifs.2007.07.011
- da Cruz Cabral, L., Pinto, V.F., Patriarca, A., 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 1–14. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.026
- Huang, Y., Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Gong, Y., Chen, X., Guo, Z., Wang, Q., Jiang, W., 2010. Antifungal activity of the essential oil of *illicium verum* fruit and its main component trans-anethole. *Molecules* 15, 7558–7569. doi:10.3390/molecules15117558

- Isman, M.B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19, 603–608. doi:10.1016/S0261-2194(00)00079-X
- Kfoury, M., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Bourdon, N., Laruelle, F., Fontaine, J., Auezova, L., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S., 2016. Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. *Food Chem.* 196, 518–525. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.078
- Khobragade, C.N., Bhande, R.M., 2012. In vitro antibacterial, membrane damage, antioxidant and antiinflammatory activities of *Barleria prionitis* L extract on UTI causing multidrug resistant *E. coli*. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 4, 64–69.
- Kralova, I., Sjöblom, J., 2009. Surfactants Used in Food Industry: A Review. *J. J. Dispers. Sci. Technol.* 30, 1363–1383. doi:10.1080/01932690902735561
- Kumar, A.D.N., Bevara, G.B., Laxmikoteswramma, K., RR, M., 2013. Antioxidant, cytoprotective and antiinflammatory activities of stem bark extract of *Semecarpus Anacardium*. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 6, 0–6.
- Lagrouh, F., Dakka, N., Bakri, Y., 2017. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *J. Mycol. Med.* doi:10.1016/j.mycmed.2017.04.008
- Lerner, A., Matthias, T., 2015. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* 14, 479–489. doi:10.1016/j.autrev.2015.01.009
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 224, 164–175. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016
- Marques, H.M.C., 2010. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour Fragr. J.* 25, 313–326. doi:10.1002/ffj.2019
- Marzoug, H.N. Ben, Romdhane, M., Lebrihi, A., Lebrihi, F., Couderc, F., Abderraba, M., Abderraba, M.L., Bouajila, J., 2011. Eucalyptus oleosa essential oils: Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the oils from different plant parts (stems, leaves, flowers and fruits). *Molecules* 16, 1695–1709. doi:10.3390/molecules16021695
- Miguel, M.G., 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules* 15, 9252–9287. doi:10.3390/molecules15129252
- Mizushima, Y., Kobayashi, M., 1968. Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *J. Pharm. Pharmacol.* 20, 169–173. doi:10.1111/j.2042-7158.1968.tb09718.x
- Naidu, A.S., 2000. *Natural Food Antimicrobial Systems*, illustrate. ed. CRC Press, 2000.
- Papuc, C., Goran, G. V., Predescu, C.N., Nicorescu, V., 2017. Mechanisms of Oxidative Processes in Meat and Toxicity Induced by Postprandial Degradation Products: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16, 96–123. doi:10.1111/1541-4337.12241
- Quiroga, E.N., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A., 2001. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 74, 89–96. doi:10.1016/S0378-8741(00)00350-0
- Raut, J.S., Karuppayil, S.M., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind. Crops Prod.* 62, 250–264. doi:10.1016/j.indcrop.2014.05.055
- Sakat, S.S., Juvekar, A.R., Gambhire, M.N., 2010. In-vitro antioxidant and anti-

- inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* linn. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2, 146–155.
- Wagacha, J.M., Muthomi, J.W., 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Prot.* 26, 877–885. doi:10.1016/j.cropro.2006.09.003
- Ye, C.-L., Dai, D.-H., Hu, W.-L., 2013. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). *Food Control* 30, 48–53. doi:10.1016/j.foodcont.2012.07.033
- Ye, Z.W., Zhang, J., Townsend, D.M., Tew, K.D., 2015. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1850, 1607–1621. doi:10.1016/j.bbagen.2014.11.010

Synthèse et perspectives

Synthèse et perspectives

La pollution des sols pose un véritable problème de santé publique et environnementale. C'est la raison pour laquelle, la remédiation des sols pollués est devenue une priorité aussi bien pour les scientifiques que pour les pouvoirs publics.

Actuellement, les méthodes les plus couramment utilisées pour dépolluer les sols sont des méthodes physiques et chimiques consistant en un traitement thermique ou en un lavage avec des solvants après excavation de ces sols. Bien qu'elles soient rapides, ces méthodes présentent l'inconvénient majeur d'être onéreuses, néfastes vis-à-vis des propriétés biologiques du sol et surtout peu adaptées aux vastes surfaces agricoles. Or le sol est une ressource naturelle limitée et non renouvelable qu'on se doit de préserver. Parmi les méthodes émergentes qui ne nuisent pas à la qualité et à la fertilité du sol figure la phytoremédiation. Cette dernière fait partie en France des actions prioritaires du Grenelle de l'environnement qui a souligné l'importance d'utiliser de préférence les techniques de dépollution par les plantes en raison de leur adéquation avec le développement durable. En effet, il s'agit d'une méthode douce de dépollution des sols qui utilise la capacité naturelle des plantes et du microbiote associé à dissiper les polluants. Cependant, le recours à cette phytotechnologie dans la gestion des sites et sols pollués reste limité aujourd'hui en raison de son efficacité qui dépend de nombreux paramètres (espèce végétale, propriétés physico-chimiques et microbiologiques du sol, phytotoxicité et biodisponibilité des polluants, caractéristiques pédo-climatiques du site, ...) mais aussi du devenir de la biomasse produite sur les sols contaminés. Pour pallier à ces problèmes, la phytoremédiation assistée, par exemple par l'apport d'amendements biologiques à base de CMA a émergé il y a une dizaine d'années. En effet, ces champignons pourraient contribuer à améliorer la production de biomasse et la dissipation des polluants. Parmi les filières de valorisation éco-innovantes présentant a priori une rentabilité supérieure aux cultures « traditionnelles », la culture de PPAM productrices d'HE a été suggérée comme une option prometteuse et viable (Lal et al., 2013 ; Verma et al., 2014) d'autant plus que ces composés à haute valeur ajoutée peuvent être

utilisés dans diverses industries non-alimentaires (cosmétiques, pharmaceutiques et phytosanitaires). Ainsi, les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse entrent dans ce contexte général et s'articulent autour de trois volets.

1. Caractérisation physico-chimique - Evaluation de l'écotoxicité et de la toxicité d'un sol de la Bekaa irrigué par les eaux du Litani

La caractérisation physico-chimique du sol d'une parcelle expérimentale de 200 m² située à Marj- Bekaa centrale et directement irriguée par les eaux du Litani a mis en évidence la pauvreté de ce sol en certains éléments nutritifs dont l'azote et le phosphore ainsi qu'une contamination par certains ETM [Ni (88 mg.Kg⁻¹), Cr (122 mg.Kg⁻¹), V (170 mg.Kg⁻¹) et Mn (551 mg.Kg⁻¹)] et polluants organiques [les alcanes (2541,1 mg.Kg⁻¹ du sol)]. Cette contamination provient probablement des eaux d'irrigation contaminées par des effluents industriels non traités (métallurgie, industrie du cuir ou de produits en papier, réparation de véhicules) directement rejetés dans le bassin versant du Litani (El-Fadel et al., 2003 ; USAID, 2012a). En revanche, aucune trace d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, de dioxines, de furanes et de pesticides n'a été détectée.

Suite à cela, notre étude a montré que cette contamination pourrait être à l'origine à la fois d'une toxicité et d'une écotoxicité mises en évidence à travers l'évaluation de plusieurs bioindicateurs. En effet, il a été montré que ce sol peut présenter un risque de cytotoxicité vis-à-vis de deux lignées cellulaires humaines hépatiques (HepG2) et pulmonaires (Beas-2B) mais aussi des effets néfastes vis-à-vis de plusieurs composantes de l'environnement dont (i) une richesse et une diversité végétales moins importantes que celle obtenues dans des prairies (Deng et al., 2016 ; Hernández et Pastor, 2008 ; Motamedi et Souri, 2016), ainsi que dans d'autres sites contaminés (Hernández et Pastor, 2008 ; Xiong et al., 1997), (ii) une réduction significative des taux de germination des graines de différentes espèces végétales (blé, trèfle, luzerne, ray-grass et fétuque) sur le sol pollué de la Bekaa par comparaison à des sols témoins non pollués, (iii) une faible richesse en microflore tellurique [bactéries Gram-positifs et Gram-négatifs, CMA et champignons saprotrophes et ectomycorhiziens] par rapport à d'autres sols contaminés et non contaminés (Bååth et al., 1992 ; Driai, 2016 ; Frostegård et al., 1993 ; Zelles et Bai, 1993).

Cependant, il est à souligner que des structures fongiques (arbuscules, vésicules et hyphes) ont été observées au niveau de la majorité des racines des plantes autochtones démontrant la capacité des CMA autochtones à coloniser les racines dans de telles conditions défavorables de contamination. C'est pourquoi, pour la poursuite de notre travail, la faisabilité de la phytoremédiation assistée par les CMA a été étudiée.

2. La phytoremédiation assistée par les CMA en utilisant une plante aromatique productrice d'HE, l'origan : efficacité sur la dissipation des polluants et la production d'HE à activités biologiques

L'objectif de cette deuxième partie de la thèse a été de tester l'intérêt d'utiliser la phytoremédiation assistée par les CMA comme outil de phytomanagement du sol agricole pollué de la Bekaa tant en terme de dépollution que de valorisation non-alimentaire de la biomasse produite dans la production des HE. Ainsi le choix de l'espèce végétale à cultiver s'est porté sur l'origan, *Origanum syriacum*, pour deux raisons principales: (i) l'origan est une plante aromatique locale bien adaptée aux conditions pédo-climatiques du Liban et (ii) cultivée pour ses HE à activités biologiques. Cependant, la capacité de cette plante à dissiper les polluants ainsi que l'effet de l'inoculation mycorhizienne sur la dissipation des polluants, sur la composition et sur les activités biologiques des HE sont peu décrits dans la littérature.

Ainsi, la capacité de phytoremédiation de l'origan a été évaluée in situ et en microcosme (sur sol stérilisé ou non) pendant 16 semaines de culture. Les taux de colonisation modérée des racines d'origan in situ et dans le sol non stérilisé et non inoculé pourraient être dû à la faible richesse et diversité des spores des CMA révélée par la première partie de cette thèse. Cependant l'ajout d'amendement biologique à base des CMA en microcosme contribue à l'amélioration significative des taux de colonisation des racines ainsi que de la biomasse foliaire sur du sol non stérilisé par rapport au sol non inoculé. La dissipation totale des alcanes à courte et moyenne chaînes carbonées in situ pourrait résulter de la nature des exsudats racinaires de l'origan qui stimulent la microflore tellurique à capacité métabolique de dégradation des alcanes (Ji et al., 2013 ; Rojo, 2009 ; Wang et Shao, 2013). Néanmoins, les faibles biomasses racinaires obtenues en microcosmes pourraient expliquer l'effet non significatif de l'inoculation mycorhizienne sur les taux de dissipation des alcanes.

Par ailleurs, il est important de noter que les HE extraites à partir des biomasses foliaires obtenues dans les différentes conditions ne présentent aucune trace d'alcane suggérant l'absence ou le faible transfert des polluants dans la biomasse foliaire. Ce résultat corrobore les travaux de Lenoir et al. (2016b). D'autre part, la variabilité des rendements en HE et de leurs compositions chimiques entre l'expérience en microcosme et in situ serait dû à des facteurs environnementaux, géographiques et écologiques (De Falco et al., 2013 ; Hassiotis et al., 2014 ; Zgheib et al. 2016). En outre, l'inoculation mycorhizienne permettrait la modification des voies de synthèse des composés majeurs des HE (Rydlová et al., 2016) ainsi que l'augmentation des teneurs des HE suite à l'amélioration de la nutrition en phosphore (Tarraf et al., 2017 ; Zeng et al., 2013) et à une augmentation de la densité des trichomes glandulaires (Copetta et al., 2006).

L'ensemble de nos résultats montrent que bien que la dissipation des alcanes et la composition des HE extraites à partir de la biomasse produite sur ce sol pollué peuvent être influencées par certains paramètres tels que les conditions de culture et la mycorhization, la phytoremédiation assistée par les CMA utilisant l'origan pourrait constituer une bonne option pour dépolluer ce sol tout en produisant des HE non contaminées ayant des activités biologiques intéressantes avec des applications dans divers domaines (phytosanitaires, cosmétiques, pharmaceutiques).

3. Etude des activités biologiques (antifongiques, anti-oxydantes et anti-inflammatoires) d'une gamme d'HE encapsulées ou non avec les cyclodextrines

La troisième partie de ce travail a consisté à étudier les activités biologiques d'HE, encapsulées dans des cyclodextrines ou non, obtenues par hydrodistillation à partir d'une large gamme d'espèces végétales : l'origan (*Origanum syriacum*), l'angélique (*Angelica archangelica*) (racines et graines), la ciboulette (*Allium schoenoprasum*), le cerfeuil (*Anthriscus cerefolium*), l'ail (*Allium tuberosum*), le poireau (*Allium porum*), l'oignon (*Allium cepa*), l'échalote (*Allium ascalonicum*) et le thuya (*Thuya atrovirens*). Les pouvoirs antifongiques (par contact direct et par volatilité), antioxydantes et anti-inflammatoires de ces huiles ont été testés, en présence et en

absence des cyclodextrines (HP- β -CD), oligosaccharides cycliques qui complexent les HE et augmentent leurs biodisponibilités (Kfoury et al., 2016).

Il a été montré que les HE testées présentent un pouvoir antifongique vis-à-vis du champignon phytopathogène *Fusarium culmorum*, avec une efficacité plus prononcée par contact direct. En effet, les concentrations inhibitrices médianes (IC50) obtenues par l'activité antifongique par volatilité sont de 1,2 à 23 fois plus importantes que celles obtenues par contact direct. D'ailleurs, toutes ces HE présentent également des activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires.

Néanmoins, l'efficacité des HE dépend de leur composition chimique. En effet, les HE extraites d'échalote, d'oignon, d'origan et d'angélique (graine) présentent une efficacité plus prononcée dans toutes les activités biologiques testées par rapport aux autres HE.

Cependant, l'ajout des cyclodextrines n'a pas d'influence significative sur les IC50 obtenues pour toutes les activités biologiques testées, sauf pour l'origan pour lequel les IC50 des activités antifongiques par contact direct et par volatilité sont significativement plus importantes en présence de cyclodextrines.

Toutes les HE testées montrent des pouvoirs antifongiques, antioxydants et anti-inflammatoires. *Néanmoins, des différences en termes d'efficacité de ces HE sont remarquables. Certaines huiles dont celles extraites d'échalote, d'oignon, d'origan et d'angélique graine sont plus efficaces que d'autres. Ceci pourrait être dû à l'abondance et à la composition de leurs principes actifs.* En effet, des principes actifs tels que les terpènes, les phenylpropanes, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, les tannins, les cumarins, les glycosides et les acides organiques, confèrent aux HE leurs activités biologiques : antibactériennes, antifongiques, antioxydantes et anti-inflammatoires (da Cruz Cabral et al., 2013 ; Miguel, 2010 ; Naidu, 2000).

Afin de compléter et de poursuivre ce travail, plusieurs perspectives peuvent être envisagées parmi lesquelles :

- 1- évaluer de la toxicité du sol agricole de la Bekaa vis-à-vis des cellules de la peau et des cellules intestinales (Chou et al., 2002). En effet, l'Homme est exposé aux

particules du sol, non seulement par voies orale et respiratoire, mais aussi par voie cutanée notamment les agriculteurs qui sont en contact direct avec le sol ;

- 2- affiner l'étude de l'identification et de la caractérisation des populations microbiennes, en particulier mycorhiziennes, du sol contaminé de la Bekaa en faisant appel à des outils de biologie moléculaire. Cette étude sera basée sur le décryptage du génome du microbiote du sol (métagénomique) pour isoler des souches indigènes bien adaptées aux conditions pédo-agronomiques et efficaces dans la phytoremédiation. Les profils taxonomiques seront analysés principalement par l'utilisation du séquençage à haut débit de marqueurs génétiques sélectionnés pour leur résolution phylogénétique (analyse des séquences ITS et 16S d'ADN ribosomique pour les champignons et bactéries respectivement) ;
- 3- produire l'inoculum local autochtone à base de CMA bien adapté aux conditions environnementales locales ;
- 4- optimiser les conditions de phytoremédiation en testant d'autres plantes aromatiques associées avec l'inoculum mycorhizien autochtone et conduire un essai in situ à partir duquel il faudra distiller les HE, analyser leur qualité et composition et tester leurs propriétés biologiques ;
- 5- valider l'efficacité de l'origan en phytoremédiation des sols dopés par des alcanes et des ETM ;
- 6- compléter l'étude des propriétés biopesticides des HE en élargissant la gamme des champignons phytopathogènes testés et en conduisant des essais in planta mais aussi en évaluant leurs activités anti-germinatives, phytotoxiques et insecticides (Isman, 2000).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

1. Abarca, R.L., Rodríguez, F.J., Guarda, A., Galotto, M.J., Bruna, J.E., 2016. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chem.* 196, 968–975. doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.023
2. Abrahams, P.W., 2002. Soils: their implications to human health. *Sci. Total Environ.* 291, 1–32. doi:10.1016/S0048-9697(01)01102-0
3. Adam, G., Duncan, H., 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ. Pollut.* 120, 363–370. doi:10.1016/S0269-7491(02)00119-7
4. Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 6, 671–672.
5. AFNOR, 1999. Recueil De Normes Françaises. Qualité Des Sols. Afnor, Paris.
6. Agence Régionale de Santé Ile-de-France, A., n.d. IUrbanisme et santé : La problématique des sites et sols pollués dans vos projets d'aménagements [WWW Document]. URL [http://saintmichelsurorge.fr/images/cadre-de-vie/plu/7.3.h Plaquette Urbanisme et Santé.pdf](http://saintmichelsurorge.fr/images/cadre-de-vie/plu/7.3.h%20Plaquette%20Urbanisme%20et%20Sant%C3%A9.pdf)
7. Agnello, A.C., Bagard, M., van Hullebusch, E.D., Esposito, G., Huguenot, D., 2016. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Sci. Total Environ.* 563–564, 693–703.
8. Alagić, S.Č., Maluckov, B.S., Radojičić, V.B., 2015. How can plants manage polycyclic aromatic hydrocarbons? May these effects represent a useful tool for an effective soil remediation? A review. *Clean Technol. Environ. Policy* 17, 597–614. doi:10.1007/s10098-014-0840-6
9. Alarcón, A., Davies, F., Autenrieth, R., Zuberer, D., 2008. Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Int. J. Phytoremediation* 10, 251–263.
10. Albro, P.W., Fishbein, L., 1970. Absorption of aliphatic hydrocarbons by rats. *Biochim. Biophys. Acta* 219, 437–446. doi:10.1007/SpringerReference_211540
11. Alexander, M., 1995. How toxic are toxic chemicals in soil? *Environ. Sci. Technol.* 29, 2713–2717. doi:10.1021/es00011a003
12. Ali, B., Al-Wabel, N.A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S.A., Anwar, F., 2015. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5, 601–611. doi:10.1016/j.apjtb.2015.05.007
13. Alrumman, S.A., Standing, D.B., Paton, G.I., 2015. Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *J. King Saud Univ. - Sci.* 27, 31–41. doi:10.1016/j.jksus.2014.10.001
14. Ambolet-Camoit, A., Ottolenghi, C., Leblanc, A., Kim, M.J., Letourneur, F., Jacques, S., Cagnard, N., Guguen-Guillouzo, C., Barouki, R., Aggerbeck, M., 2015. Two persistent organic pollutants which act through different xenosensors (alpha-endosulfan and 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin) interact in a mixture and downregulate multiple genes invol-

- ved in human hepatocyte lipid and glucose metabolism. *Biochimie* 116, 79–91. doi:10.1016/j.biochi.2015.07.003
15. An, Y.J., 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environ. Pollut.* 127, 21–26. doi:10.1016/S0269-7491(03)00263-X
16. Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M.A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell’Amico, E., Colombo, M., Gianfreda, L., 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57, 401–412. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.06.013
17. Angelova, V.R., Perifanova-Nemska, M.N., Uzunova, G.P., Ivanov, K. i., Lee, H.Q., 2016. Potential of sunflower for phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. *Int. J. Biol. Biomol. Agric. Food Biotechnol. Eng.* 10, 551–558.
18. Ankri, S., Mirelman, D., 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* 1, 125–129. doi:10.1016/S1286-4579(99)80003-3
19. Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E.H.A., Casabianca, H., Mousadik, A. El, Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R., Elaissari, A., 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm.* 483, 220–243. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.069
20. Asgari Lajayer, B., Ghorbanpour, M., Nikabadi, S., 2017. Heavy metals in contaminated environment: Destiny of secondary metabolite biosynthesis, oxidative status and phytoextraction in medicinal plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145, 377–390. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.07.035
21. Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., Simal-G??ndara, J., 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocoll.* 23, 1631–1640. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.01.001
22. Augé, R.M., 2001. Water relations, drought and vesicular–arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11, 3–42.
23. Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* 117, 426–436. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014

B

24. Bååth, E., Frostegård, Å., Fritze, H., 1992. Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 4026–4031.
25. Baderna, D., Colombo, A., Amodei, G., Cantù, S., Teoldi, F., Cambria, F., Rotella, G., Natolino, F., Lodi, M., Benfenati, E., 2013. Chemical-based risk assessment and in vitro models of human health effects induced by organic pollutants in soils from the Olona valley. *Sci. Total Environ.* 463–464, 790–801. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.06.088
26. Baderna, D., Maggioni, S., Boriani, E., Gemma, S., Molteni, M., Lombardo, A., Colombo, A., Bordonali, S., Rotella, G., Lodi, M., Benfenati, E., 2011. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill’s leachate: Chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. *Environ. Res.* 111, 603–613. doi:10.1016/j.envres.2011.01.015
27. Bago, B., Pfeffer, P.E., Shachar-hill, Y., 2000. Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiol.* 124, 949–957.
28. Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
29. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of

- essential oils - A review. Food Chem. Toxicol. 46, 446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
30. Barrowman, J.A., Rahman, A., Lindstrom, M.B., Borgstrom, B., 1989. Intestinal absorption and metabolism of Hydrocarbons. Prog. Lipid Res. 28, 189–203. doi:10.1016/0163-7827(89)90012-X
31. Baydar, H., Sa, O., 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey 15, 169–172. doi:10.1016/S0956-7135(03)00028-8
32. Ben Hsouna, A., Hamdi, N., Ben Halima, N., Abdelkafi, S., 2013. Characterization of essential oil from *Citrus aurantium* L. flowers: antimicrobial and antioxidant activities. J. Oleo Sci. 62, 763–72. doi:10.5650/jos.62.763
33. Bencherif, K., Boutekrabt, A., Fontaine, J., Laruelle, F., Dalpé, Y., Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2015. Impact of soil salinity on arbuscular mycorrhizal fungi biodiversity and microflora biomass associated with *Tamarix articulata* Vahl rhizosphere in arid and semi-arid Algerian areas. Sci. Total Environ. 533, 488–494. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.07.007
34. Benkeblia, N., 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). LWT - Food Sci. Technol. 37, 263–268. doi:10.1016/j.lwt.2003.09.001
35. Berka-Zougali, B., Ferhat, M.A., Hassani, A., Chemat, F., Allaf, K.S., 2012. Comparative study of essential oils extracted from Algerian *myrtus communis* L. leaves using microwaves and hydrodistillation. Int. J. Mol. Sci. 13, 4673–4695. doi:10.3390/ijms13044673
36. Bert, V., Allemon, J., Sajet, P., Dieu, S., Papin, A., Collet, S., Gaucher, R., Chalot, M., Michiels, B., Raventos, C., 2017. Torrefaction and pyrolysis of metal-enriched poplars from phytotechnologies: Effect of temperature and biomass chlorine content on metal distribution in end-products and valorization options. Biomass and Bioenergy 96, 1–11. doi:10.1016/j.biombioe.2016.11.003
37. Bert, V., Collet, S., Delgratta, F., Schnuriger, B., Dimitriou, J., Herzig, R., Vangronsveld, J., Mench, M., Loppinet-Serani, A., Lemaitre, P., Sarraill, G., 2012. Valorization of plant biomass harvested at trace element-contaminated sites managed by gentle (phyto) remediation options, in: 9. International Phytotechnology Society (IPS). Hasselt, Belgium.
38. Bhalerao, S.A., 2013. Arbuscular Mycorrhizal Fungi: a potential biotechnological tool for phytoremediation of heavy metal contaminated soils. Int. J. Sci. Nat. 4, 1–15.
39. Bhogal, A., Nicholson, F.A., Chambers, B.J., 2009. Organic carbon additions: Effects on soil bio-physical and physico-chemical properties. Eur. J. Soil Sci. 60, 276–286. doi:10.1111/j.1365-2389.2008.01105.x
40. Blaszkowski, J., 2012. Glomeromycota. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences.
41. Bonfante, P., Genre, A., 2015. Arbuscular mycorrhizal dialogues: do you speak “plantish” or “fungish”? Trends Plant Sci. 20, 150–154.
42. Bonfante, P., Genre, A., 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. Nat. Commun. 1, 11. doi:10.1038/ncomms1046
43. Bonfante, P., Genre, A., 2008. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. Trends Plant Sci. 13, 492–498. doi:10.1016/j.tplants.2008.07.001
44. Bonfante, P., Perotto, S., 1995. Tansley Review No. 82. New Phytol. 130, 3–21.
45. Bonfante, P., Requena, N., 2011. Dating in the dark: How roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. Curr. Opin. Plant Biol. 14, 451–457.

- doi:10.1016/j.pbi.2011.03.014
46. Bou Kheir, R., Greve, M.H., Abdallah, C., Dalgaard, T., 2010. Spatial soil zinc content distribution from terrain parameters: A GIS-based decision-tree model in Lebanon. *Environ. Pollut.* 158, 520–528. doi:10.1016/j.envpol.2009.08.009
 47. Boubaker, H., Karima, H., Hamdaoui, A. El, Msandaa, F., Leachb, D., Bombardac, I., Vanloot, P., Abbadd, A., Boudyacha, E.H., Ait Ben Aouma, A., 2016. Chemical characterization and antifungal activities of four *Thymus* species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. *Ind. Crops Prod.* 86, 95–101. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.036
 48. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
 49. Braun-Blanquet, J., 1951. *Pflanzensoziologie. Grundzüge der Veg.* Springer, Wien.
 50. Brewster, M.E., Loftsson, T., 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 645–666. doi:10.1016/j.addr.2007.05.012
 51. Broadway, A., Cave, M.R., Wragg, J., Fordyce, F.M., Bewley, R.J.F., Graham, M.C., Ngwenya, B.T., Farmer, J.G., 2010. Determination of the bioaccessibility of chromium in Glasgow soil and the implications for human health risk assessment. *Sci. Total Environ.* 409, 267–277. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.09.007

C

52. Cabello, M.N., 1997. Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiol. Ecol.* 22, 233–236. doi:10.1111/j.1574-6941.1997.tb00375.x
53. Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C., 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control* 54, 111–119. doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.040
54. Carré, F., Caudeville, J., Bonnard, R., Bert, V., Boucard, P., Ramel, M., 2017. Soil Contamination and Human Health: A Major Challenge for Global Soil Security, in: Field D.J., Morgan C.L.S., M.A.B. (Ed.), *Global Soil Security. Progress in Soil Science.* Springer, Cham, pp. 275–295. doi:10.1007/978-3-319-43394-3_25
55. CCME, Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health., 2007.
56. Chaîneau, C.H., Yepremian, C., Vidalie, J.F., Ducreux, J., Ballerini, D., 2003. Bioremediation of a crude oil-polluted soil: Biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water. Air. Soil Pollut.* 144, 419–440. doi:10.1023/A:1022935600698
57. Chalhoub, M., Vachier, P., Coquet, Y., Darwish, T., Dever, L., Mroueh, M., 2009. Caractérisation des propriétés hydrodynamiques d'un sol de la Bekaa (Liban) sur les rives du fleuve Litani. *Etude Gest. des Sols* 16, 67–84.
58. Chen, B.D., Zhu, Y.-G., Duan, J., Xiao, X.Y., Smith, S.E., 2007. Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and metal uptake by four plant species in copper mine tailings. *Environ. Pollut.* 147, 374–380. doi:10.1016/j.envpol.2006.04.027
59. Chen, W., Li, J., Sun, X., Min, J., Hu, X., 2017. High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium *Dietzia* species CN-3. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 118, 110–118. doi:10.1016/j.ibiod.2017.01.029
60. Chippada, S.C., Volluri, S.S., Bammidi, S.R., Vangalapati, M., 2011. In vitro anti inflammatory activity of methanolic extract of *centella asiatica* by HRBC membrane stabilisation. *Rasayan J. Chem.* 4, 457–460.

61. Chou, C.-C., Riviere, J.E., Monteiro-Riviere, N.A., 2002. Differential relationship between the carbon chain length of jet fuel aliphatic hydrocarbons and their ability to induce cytotoxicity vs. interleukin-8 release in human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Sci.* 69, 226–233. doi:10.1093/toxsci/69.1.226
62. Ciesielski, H., Sterckeman, T., 1997. A comparison between three methods for the determination of cation exchange capacity and exchangeable cations in soils. *Agronomie* 17, 9–15.
63. Clark, R., Zeto, S., 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *J. Plant Nutr.* 23, 867–902. doi:10.1080/01904160009382068
64. Comby, M., Mustafa, G., Magnin-Robert, M., Randoux, B., Fontaine, J., Reignault, P., Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2017. Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Potential Bioprotectants Against Aerial Phytopathogens and Pests, in: Wu, Q.-S. (Ed.), *Arbuscular Mycorrhizas and Stress Tolerance of Plants*. Springer. doi:10.1007/978-981-10-4115-0
65. Conesa, H.M., Evangelou, M.W.H., Robinson, B.H., Schulin, R., 2012. A Critical View of Current State of Phytotechnologies to Remediate Soils: Still a Promising Tool? *Sci. World J.* 2012, 1–10. doi:10.1100/2012/173829
66. Copetta, A., Lingua, G., Berta, G., 2006. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. Genovese. *Mycorrhiza* 485–494.
67. Corzo-Martínez, M., Corzo, N., Villamiel, M., 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 609–625. doi:10.1016/j.tifs.2007.07.011
68. Criquet, S., Joner, E., Leglize, P., Leyval, C., 2000. Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Biotechnology Letters*, 22 (21), 1733-1737.
69. da Cruz Cabral, L., Pinto, V.F., Patriarca, A., 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 1–14. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.026

D

70. Dajoz, R., 2008. *La Biodiversité l'avenir de la planète et de l'homme*. Ellipses.
71. Dalpé, Y., 2005. Les mycorhizes: Un outil de protection des plantes mais non une panacée. *Phytoprotection* 86, 53–59. doi:10.7202/011715ar
72. Daouk, R., Dagher, S., 1995. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *J. Food Prot.* 58.
73. Darwish, T., Atallah, T., Francis, R., Saab, C., Jomaa, I., Shaaban, A., Sakka, H., Zdruli, P., 2011. Observations on soil and groundwater contamination with nitrate: A case study from Lebanon-East Mediterranean. *Agric. Water Manag.* 99, 74–84. doi:10.1016/j.agwat.2011.07.016
74. Darwish, T., Jomaa, I., Khawlie, M., Mýyuller, H.W., Moller, A., 2004. Assessment Of Heavy Metal Contamination Of Arable Soils In Central Bekaa Plain, Lebanon, in: *Arab Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy*. Sana'a.
75. Davies, N.W., 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *J. Chromatogr. A* 503, 1–24.
76. De Falco, E., Mancini, E., Roscigno, G., Mignola, E., Taglialatela-Scafati, O., Senatore, F., 2013. Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* L. under Different Growth Conditions. *Molecules* 18, 14948–14960. doi:10.3390/molecules181214948
77. de Medeiros, F.C.M., Gouveia, F.N., Bizzo, H.R., Vieira, R.F., Del Menezzi, C.H.S.,

2016. Fungicidal activity of essential oils from Brazilian Cerrado species against wood decay fungi. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 114, 87–93. doi:10.1016/J.IBIOD.2016.06.003
78. Debiane, D., Calonne, M., Fontaine, J., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2011. Lipid content disturbance in the arbuscular mycorrhizal, *Glomus irregulare* grown in monoxenic conditions under PAHs pollution. *Fungal Biol.* 115, 782–792. doi:10.1016/j.funbio.2011.06.003
79. Debiane, D., Garçon, G., Verdin, A., Fontaine, J., Durand, R., Grandmougin-Ferjani, A., Shirali, P., Sahraoui, A.L.-H., 2008. In vitro evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environ. Exp. Bot.* 64, 120–127. doi:10.1016/j.envexpbot.2008.04.003
80. Debiane, D., Garçon, G., Verdin, A., Fontaine, J., Durand, R., Shirali, P., Grandmougin-Ferjani, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2009. Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an in vitro chicory root model. *Phytochemistry* 70, 1421–1427. doi:10.1016/j.phytochem.2009.07.002
81. Degerli, S., Tepe, B., Celiksoz, A., Berk, S., Malatyali, E., 2012. In vitro amoebicidal activity of *Origanum syriacum* and *Origanum laevigatum* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Exp. Parasitol.* 131, 20–24. doi:10.1016/j.exppara.2012.02.020
82. Del Valle, E.M.M., 2004. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochem.* 39, 1033–1046. doi:10.1016/S0032-9592(03)00258-9
83. Delplanque, M., Collet, S., Del Gratta, F., Schnuriger, B., Gaucher, R., Robinson, B., Bert, V., 2013. Combustion of *Salix* used for phytoextraction: The fate of metals and viability of the processes. *Biomass and Bioenergy* 49, 160–170. doi:10.1016/j.biombioe.2012.12.026
84. Demirbas, A., 2004. Effect of initial moisture content on the yields of oily products from pyrolysis of biomass. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 71, 803–815. doi:10.1016/j.jaap.2003.10.008
85. Deng, L., Wang, K., Li, J., Zhao, G., Shangguan, Z., 2016. Effect of soil moisture and atmospheric humidity on both plant productivity and diversity of native grasslands across the Loess Plateau, China. *Ecol. Eng.* 94, 525–531. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.06.048
86. Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 2012. Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM_{2.5-0.3}) produced in rural, urban, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Chem. Res. Toxicol.* 25, 904–919. doi:10.1021/tx200529v
87. Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Cazier, F., Billet, S., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 2015. Temporal-spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution Particulate Matter (PM_{2.5-0.3}) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Environ. Res.* 137, 256–267. doi:10.1016/j.envres.2014.12.015
88. Dhiman, S.S., Selvaraj, C., Li, J., Singh, R., Zhao, X., Kim, D., Kim, J.Y., Kang, Y.C., Lee, J., 2016. Phytoremediation of metal-contaminated soils by the hyperaccumulator canola (*Brassica napus* L.) and the use of its biomass for ethanol production. *Fuel* 183, 107–114. doi:10.1016/J.FUEL.2016.06.025
89. Diab, W., Toufaily, J., Villieras, F., Koubayssi, B., Mortada, H., Lakis, H., Hamieh, T., 2014. Study of physicochemical properties of colloidal sediments of Litani river in Lebanon. *Phys. Procedia* 55, 251–258.
90. Dorantes, A.R., Angélica, L., Zúñiga, G., 2012. Phenoloxidases activity in root system and their importance in the phytoremediation of organic contaminants. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* 4, 35–40. doi:10.5897/JECE11.012x

91. Driai, S., 2016. Impact des polluants d'origine industrielle sur le développement des champignons mycorrhiziens à arbuscules, sur leur diversité et sur la viabilité microbienne des sols des agro-écosystèmes du Nord-est algérien. Université BADJI MOKHTAR-ANNABA.
92. Dvořák, Z., Kosina, P., Walterová, D., Šimánek, V., Bachleda, P., Ulrichová, J., 2003. Primary cultures of human hepatocytes as a tool in cytotoxicity studies: cell protection against model toxins by flavonolignans obtained from *Silybum marianum*. *Toxicol. Lett.* 137, 201–212. doi:10.1016/S0378-4274(02)00406-X

E

93. El-Fadel, M., Maroun, R., Bsar, R., Makki, M., Reiss, P., Rothberg, D., 2003. Water Quality Assessment of the Upper Litani River Basin and The Lake Qaraoun Lebanon.
94. El-Shatnawi, M.K.J., Makhadmeh, I.M., 2001. Ecophysiology of the plant-rhizosphere system. *J. Agron. Crop Sci.* 187, 1–9.
95. El Abdouni Khiyari, M., Kasrati, A., Alaoui Jamali, C., Zeroual, S., Markouk, M., Bekkouche, K., Wohlmuth, H., Leach, D., Abbad, A., 2014. Chemical composition, antioxidant and insecticidal properties of essential oils from wild and cultivated *Salvia aucheri* subsp. *blancoana* (Webb. & Helder), an endemic, threatened medicinal plant in Morocco. *Ind. Crops Prod.* 57, 106–109. doi:10.1016/J.INDCROP.2014.03.029
96. El Ouadi, Y., Manssouri, M., Bouyanzer, A., Majidi, L., Bendaif, H., Elmsellem, H., Shariati, M.A., Melhaoui, A., Hammouti, B., 2017. Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa officinalis* originating from north-Est Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Microb. Pathog.* 107, 321–326. doi:10.1016/j.micpath.2017.04.004
97. Emami Tabataba, L., Irfan, M.F., Wan Daud, W.A.M., Chakrabarti, M.H., 2012. The effect of temperature on various parameters in coal, biomass and CO-gasification: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16, 5584–5596. doi:10.1016/j.rser.2012.06.015
98. Europe, C. of, 1997. European Pharmacopoeia, 3rd ed. Strasbourg.

F

99. Favas, P.J., Pratas, J., Varun, M., D'Souza, R., Paul, M.S., 2014. Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: potential of native flora, in: Maria C. Hernandez-Soriano (Ed.), *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*. Tech. doi:10.5772/57469
100. Fernandez, M.D., Cagigal, E., Vega, M., Urzelai, A., Babin, M., Pro, J., Tarazona, J.V., 2005. Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62, 174–184. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.11.013
101. Filly, A., Fernandez, X., Minuti, M., Visinoni, F., Cravotto, G., Chemat, F., 2014. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: From laboratory to pilot and industrial scale. *Food Chem.* 150, 193–198. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.139
102. Firmin, S., Labidi, S., Fontaine, J., Laruelle, F., Tisserant, B., Nsanganwimana, F., Pourrut, B., Dalpé, Y., Grandmougin, A., Douay, F., Shirali, P., Verdin, A., Sahraoui, A.L.-H., 2015. Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation protects *Miscanthus × giganteus* against trace element toxicity in a highly metal-contaminated site. *Sci. Total Environ.* 527–528, 91–99. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2015.04.116
103. Forbes, V.E., Forbes, T.L., 1994. *Ecotoxicology in Theory and Practice*, illustrate. ed.

Chapman & Hall Ecotoxicology, London.

104. Frostegård, A., Tunlid, A., Bååth, E., 1993. Phospholipid Fatty Acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3605–3617.
105. Frostegård, Å., Tunlid, A., Bååth, E., 1991. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *J. Microbiol. Methods* 14, 151–163. doi:10.1016/0167-7012(91)90018-L

G

106. Gendy, A.N. El, Leonardi, M., Mugnaini, L., Bertelloni, F., Ebani, V. V., Nardoni, S., Mancianti, F., Hendawy, S., Omer, E., Pistelli, L., 2015. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild and cultivated *Origanum syriacum* plants grown in Sinai, Egypt. *Ind. Crops Prod.* 67, 201207. doi:10.1016/j.indcrop.2015.01.038
107. Genre, A., Bonfante, P., 2010. The making of symbiotic cells in Arbuscular Mycorrhizal roots, in: Kapulnik, H.K. and Y. (Ed.), *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer Science & Business Media, 2010, Torino, Italy, p. 323. doi:10.1016/S0038-0717(01)00097-9
108. Gerdemann, J.W., Nicolson, T.H., 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46, 235–244. doi:10.1016/S0007-1536(63)80079-0
109. Gerhardt, K.E., Gerwing, P.D., Greenberg, B.M., 2017. Opinion: Taking phytoremediation from proven technology to accepted practice. *Plant Sci.* 256, 170–185. doi:10.1016/J.PLANTSCI.2016.11.016
110. Gerhardt, K.E., Huang, X.-D., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Sci.* 176, 20–30. doi:10.1016/j.plantsci.2008.09.014
111. Ghosh, M., Singh, S.P., 2005. Asian Journal on Energy and Environment A Review on Phytoremediation of Heavy Metals and Utilization of It's by Products. *As. J. Energy Env* 6, 214–231. doi:10.1007/s10681-014-1088-2
112. Giller, K.E., Witter, E., Mcgrath, S.P., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1389–1414. doi:10.1016/S0038-0717(97)00270-8
113. Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P., 2009. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biol. Biochem.* 41, 2031–2037. doi:10.1016/j.soilbio.2009.04.026
114. Gong, P., 2001. Evaluation and refinement of a continuous seed germination and early seedling growth test for the use in the ecotoxicological assessment of soils 44.
115. González-Chávez, M.C., Carrillo-González, R., Wright, S.F., Nichols, K.A., 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ. Pollut.* 130, 317–323. doi:10.1016/j.envpol.2004.01.004
116. González-Coloma, A., Martín-Benito, D., Mohamed, N., Garcia-Vallejo, M.C., Soria, A.C., 2006. Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* L. *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 609–616. doi:10.1016/J.BSE.2006.02.006
117. Gonzalez, M.S., Lima, B.G., Oliveira, A.F.R., Nunes, D.D., Fernandes, C.P., Santos, M.G., Tietbohl, L.A.C., Mello, C.B., Rocha, L., Feder, D., 2014. Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* on the development of agricultural pest insects. *Rev. Bras. Farmacogn.* 24, 413–418. doi:10.1016/J.BJP.2014.05.003

118. Govindappa, M., Sadananda, T.S., Channabasava, R., Raghavendra, V.B., 2011. In vitro anti-inflammatory, lipoxygenase, xanthine oxidase and acetylcholinesterase inhibitory activity of *Tecoma stans* (L.) Juss. Ex kunth. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 2, 275–285.
119. Greene, J.C., Bartels, C.L., Warren-Hicks, W.J. Parkhurst, B.R., Linder, G.L., Peterson, S.A., Miller, W.E., 1989. Protocols for Short-Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites., EPA/600/3-88/029. Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR (USA).
120. Gupta, V., Chauhan, S., Prakash, A., Mathur, A., 2013. Evaluation of in vitro and invivo anti-inflammatory activities of *Parthenium camphora*. *Recent Res. Sci. Technol.* 5, 33–39.

H

121. Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1–15. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.03.137
122. Harrison, M.J., 1999. Molecular and Cellular Aspects of the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 361–389. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.361
123. Hart, M.M., Forsythe, J.A., 2012. Using arbuscular mycorrhizal fungi to improve the nutrient quality of crops; nutritional benefits in addition to phosphorus. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 148, 206–214. doi:10.1016/j.scienta.2012.09.018
124. Hassan, S.E.-D., Boon, E., St-Arnaud, M., Hijri, M., 2011. Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils. *Mol. Ecol.* 20, 3469–3483. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05142.x
125. Hassiotis, C.N., Ntana, F., Lazari, D.M., Poullos, S., Vlachonasios, K.E., 2014. Environmental and developmental factors affect essential oil production and quality of *Lavandula angustifolia* during flowering period. *Ind. Crops Prod.* 62, 359–366. doi:10.1016/j.indcrop.2014.08.048
126. Hawley, J.K., 1985. Assessment of health risk from exposure to contaminated soil. *Risk Anal.* 5, 289–302.
127. Haydar, C., Nehme, N., Awad, S., Koubayssi, B., Fakih, M., Yaacoub, A., Toufaily, J., Villeras, F., Hamieh, T., 2016. Physiochemical and Microbial Assessment of Water Quality in the Upper Litani River Basin. *J. Environ. Earth Sci.* 4, 2224–3216.
128. Hernández, A.J., Pastor, J., 2008. Relationship between plant biodiversity and heavy metal bioavailability in grasslands overlying an abandoned mine. *Environ. Geochem. Health* 30, 127–133. doi:10.1007/s10653-008-9150-4
129. Hildebrandt, U., Regvar, M., Bothe, H., 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68, 139–146. doi:10.1016/j.phytochem.2006.09.023
130. Hooker, J.E., Piatti, P., Cheshire, M.V., Watson, C.A., 2007. Polysaccharides and monosaccharides in the hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus* E3 and *Glomus tenue*. *Soil Biol. Biochem.* 39, 680–683. doi:10.1016/j.soilbio.2006.08.006
131. Huang, H., Zhang, S., Shan, X., Chen, B.-D., Zhu, Y.-G., Bell, J.N.B., 2007. Effect of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus caledonium*) on the accumulation and metabolism of atrazine in maize (*Zea mays* L.) and atrazine dissipation in soil. *Environ. Pollut.* 146, 452–457. doi:10.1016/j.envpol.2006.07.001
132. Huang, J., Tang, M., Niu, Z., Zhang, R., 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi in

- petroleum-contaminated soil in Suining area of Sichuan Province. Chinese J. Ecol. 9 14.
133. Huang, Y., Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Gong, Y., Chen, X., Guo, Z., Wang, Q., Jiang, W., 2010. Antifungal activity of the essential oil of *Illicium verum* fruit and its main component trans-anethole. *Molecules* 15, 7558–7569. doi:10.3390/molecules15117558
 134. Huseini, H.F., Larijani, B., Heshmat, R., Fakhrzadeh, H., Radjabipour, B., Toliat, T., Raza, M., 2006. The efficacy of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Phyther. Res.* 20, 1036–1039. doi:10.1002/ptr.1988

I

135. Ibrahim, L., Karaky, M., Ayoub, P., El Ajouz, N., Ibrahim, S., 2012. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil and its components from Lebanese *Origanum syriacum* L. *J. Essent. Oil Res.* 24, 339–345. doi:10.1080/10412905.2012.692900
136. Iffis, B., St-Arnaud, M., Hijri, M., 2014. Bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungi within roots of plants growing in a soil highly contaminated with aliphatic and aromatic petroleum hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Lett.* 358, 44–54.
137. INERIS, 2012. Réutilisation des terres excavées sur des projets d'aménagement : élaboration des seuils vis-à-vis des risques sanitaires.
138. Isman, M.B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19, 603–608. doi:10.1016/S0261-2194(00)00079-X
139. ISO, 1999. Soil Quality. Guidance on the ecotoxicological characterisation of soils and soil materials. Guidelines no ISO TC 190/ SC 7 ISO/DIS 15799. ISO, Geneva, Switzerland.

J

140. Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N., 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* 7, 60–72. doi:10.2478/intox-2014-0009
141. Jamal, A., Ayub, N., Usman, M., Khan, A.G., 2002. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Enhance Zinc and Nickel Uptake from Contaminated Soil by Soybean and Lentil. *Int. J. Phytoremediation* 4, 205–221. doi:10.1080/15226510208500083
142. Jennings, T.S., 2012. Qualitative Analysis of Flavour and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography. Elsevier.
143. Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., Bartlam, M., 2013. Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Front. Microbiol.* 4, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2013.00058
144. Jisha, C.K., Baudh, K., Shukla, S., 2017. Phytoremediation and Bioenergy Production Efficiency of Medicinal and Aromatic Plants, in: Baudh K., Singh B., K.J. (Ed.), *Hyto remediation Potential of Bioenergy Plants*. Springer, Singapore. doi:https://doi.org/10.1007/978-981-10-3084-0_11
145. Joner, E.J., Leyval, C., 2003. Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizosphere interactions. *Sustain. Agric.* 7, 885–894.
146. Joner, E.J., Leyval, C., 2003. Rhizosphere Gradients of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Dissipation in Two Industrial Soils and the Impact of Arbuscular Mycorrhiza. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2371–2375. doi:10.1021/es020196y

K

147. Kandikattu Karthik, Bharath Rathna Kumar P, Venu Priya R, Sunil Kumar K, R.S.B.R., 2013. Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of *Canthium Parviflorum* By in-Vitro Method. *Indian J. Res. Pharm. Biotechnol.* 1, 729–731.
148. Karthik, D., Vijayarekha, K., Manickkam, V., 2014. Land Characterizations Based on Soil Properties Using Clustering Techniques. *World Appl. Sci. J.* 29, 60–64. doi:10.5829/idosi.wasj.2014.29.dmsct.11
149. Kfoury, M., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Bourdon, N., Laruelle, F., Fontaine, J., Auezova, L., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S., 2016. Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. *Food Chem.* 196, 518–525. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.078
150. Khaosaad, T., Vierheilig, H., Nell, M., Zitterl-Eglseer, K., Novak, J., 2006. Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza* 16, 443–446. doi:10.1007/s00572-006-0062-9
151. Khobragade, C.N., Bhande, R.M., 2012. In vitro antibacterial, membrane damage, antioxidant and antiinflammatory activities of *Barleria prionitis* L extract on UTI causing multidrug resistant *E. coli*. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 4, 64–69.
152. Kirk, J.L., Moutoglis, P., Klironomos, J., Lee, H., Trevors, J.T., 2005. Toxicity of diesel fuel to germination, growth and colonization of *Glomus intraradices* in soil and in vitro transformed carrot root cultures. *Plant Soil* 270, 23–30. doi:10.1007/s11104-004-1013-x
153. Knox, P., Uphill, P.F., Fry, J.R., Benford, J., Balls, M., 1986. The frame multicentre project on In vitro cytotoxicology. *Food Chem. Toxicol.* 24, 457–463. doi:10.1016/0278-6915(86)90092-X
154. Kohl, S.M., Klein, M.S., Hochrein, J., Oefner, P.J., Spang, R., Gronwald, W., 2012. State-of-the art data normalization methods improve NMR-based metabolomic analysis. *Metabolomics* 8, 146–160.
155. Koul, O., Walia, S., Dhaliwal, G.S., 2008. Essential oils as green pesticides: Potential and constraints. *Biopestic. Int.* 4, 63–84. doi:0973-483X/08/63-84
156. Kouzayha, A., 2013. Développement des méthodes analytiques pour la détection et la quantification de traces des HAP et de pesticides dans l'eau. Application à l'évaluation de la qualité des eaux libanaises. Université Sciences et Technologies-Bordeaux I.
157. Kralova, I., Sjöblom, J., 2009. Surfactants Used in Food Industry: A Review. *J. J. Dispers. Sci. Technol.* 30, 1363–1383. doi:10.1080/01932690902735561
158. Kumar, A.D.N., Bevara, G.B., Laxmikoteswamma, K., RR, M., 2013. Antioxidant, cytoprotective and antiinflammatory activities of stem bark extract of *Semecarpus Anacardium*. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 6, 0–6.
159. Kumbıçak, Ü., Çavaş, T., Çinkılıç, N., Kumbıçak, Z., Vatan, Ö., Yılmaz, D., 2014. Evaluation of in vitro cytotoxicity and genotoxicity of copper-zinc alloy nanoparticles in human lung epithelial cells. *Food Chem. Toxicol.* 73, 105–112. doi:10.1016/j.fct.2014.07.040
160. Kumpiene, J., Bert, V., Dimitriou, I., Eriksson, J., Friesl-Hanl, W., Galazka, R., Herzig, R., Janssen, J., Kidd, P., Mench, M., M?ller, I., Neu, S., Oustriere, N., Puschenreiter, M., Renella, G., Roumier, P.-H., Siebielec, G., Vangronsveld, J., Manier, N., 2014. Selecting chemical and ecotoxicological test batteries for risk assessment of trace element-contaminated soils (phyto)managed by gentle remediation options (GRO). *Sci. Total Environ.* 496, 510–522. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.130
161. Kwak, J. Il, Kim, S.W., An, Y.-J., 2014. A new and sensitive method for measuring in

vivo and in vitro cytotoxicity in earthworm coelomocytes by flow cytometry. *Environ. Res.* 134, 118–126. doi:10.1016/j.envres.2014.07.014

L

162. Labidi, S., Fontaine, J., Laruelle, F., Tisserant, B., Dalpé, Y., Grandmougin-Ferjani, A., Douay, F., Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2015. Fly ash-aided phytostabilisation of highly trace element polluted topsoils improves the telluric fungal biomass: A long-term field experiment. *Appl. Soil Ecol.* 85, 69–75. doi:10.1016/j.apsoil.2014.09.006
163. Lagrouh, F., Dakka, N., Bakri, Y., 2017. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *J. Mycol. Med.* doi:10.1016/j.mycmed.2017.04.008
164. Lal, K., Yadav, R.K., Kaur, R., Bundela, D.S., Khan, M.I., Chaudhary, M., Meena, R.L., Dar, S.R., Singh, G., 2013. Productivity , essential oil yield , and heavy metal accumulation in lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) under varied wastewater – groundwater irrigation regimes. *Ind. Crop. Prod.* 45, 270–278. doi:10.1016/j.indcrop.2013.01.004
165. Lenoir, I., Fontaine, J., Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2016a. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry* 123, 4–15. doi:10.1016/j.phytochem.2016.01.002
166. Lenoir, I., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Frédéric, L., Yolande, D., Joël, F., 2016b. 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
167. Lenoir, I., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Fontaine, J., 2016c. Arbuscular mycorrhizal fungal-assisted phytoremediation of soil contaminated with persistent organic pollutants: a review. *Eur. J. Soil Sci.* 67, 624–640. doi:10.1111/ejss.12375
168. Lerner, A., Matthias, T., 2015. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* 14, 479–489. doi:10.1016/j.autrev.2015.01.009
169. Leung, H.-M., Wang, Z.-W., Ye, Z.-H., Yung, K.-L., Peng, X.-L., Cheung, K.-C., 2013. Interactions between arbuscular mycorrhizae and plants in phytoremediation of metal-contaminated soils: A review. *Pedosphere* 23, 549–563. doi:10.1016/S1002-0160(13)60049-1
170. Leung, H.M., Ye, Z.H., Wong, M.H., 2006. Interactions of mycorrhizal fungi with *Pteris vittata* (As hyperaccumulator) in As-contaminated soils. *Environ. Pollut.* 139, 1–8. doi:10.1016/j.envpol.2005.05.009
171. Liang, J., You, C., Guo, S., Zhang, W., Li, Y., Geng, Z., Wang, C., Du, S., Deng, Z., Zhang, J., 2016. Chemical constituents of the essential oil extracted from *Rhododendron thymifolium* and their insecticidal activities against *Liposcelis bostrychophila* or *Tribolium castaneum*. *Ind. Crops Prod.* 79, 267–273. doi:10.1016/J.INDCROP.2015.11.002
172. Lievens, C., Yperman, J., Cornelissen, T., Carleer, R., 2008. Study of the potential valorisation of heavy metal contaminated biomass via phytoremediation by fast pyrolysis: Part II: Characterisation of the liquid and gaseous fraction as a function of the temperature. *Fuel* 87, 1906–1916. doi:10.1016/j.fuel.2007.10.023
173. Loftsson, T., Hreinsdóttir, D., Másson, M., 2005. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int. J. Pharm.* 302, 18–28. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.05.042
174. Loizzo, M.R., Menichini, F., Conforti, F., Tundis, R., Bonesi, M., Saab, A.M., Statti,

- G.A., Cindio, B. de, Houghton, P.J., Menichini, F., Frega, N.G., 2009. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chem.* 117, 174–180. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.095
175. Lopareva-Pohu, A., 2011. Intérêt de la phytostabilisation aidée pour la gestion des sols pollués par des éléments traces métalliques (Cd, Pb, Zn). Université du Littoral Côte d'Opale.
176. Lu, Y.-F., Lu, M., Peng, F., Wan, Y., Liao, M.-H., 2014. Remediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil by using a combination of ryegrass, arbuscular mycorrhizal fungi and earthworms. *Chemosphere* 106, 44–50. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.12.089
177. Luo, X.S., Ding, J., Xu, B., Wang, Y.J., Li, H.B., Yu, S., 2012. Incorporating bioaccessibility into human health risk assessments of heavy metals in urban park soils. *Sci. Total Environ.* 424, 88–96. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.02.053
178. Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 224, 164–175. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016
179. Madejon, P., Burgos, P., Cabrera, F., Madejon, E., 2009. Phytostabilization of amended soils polluted with trace elements using the Mediterranean shrub: *Rosmarinus officinalis*. *Int. J. Phytoremediation* 11, 542–557.

M

180. Marcon, E., 2015. Mesures de la Biodiversité.
181. Margalef, R., 1958. Information theory in ecology. *Gen. Syst.* 3, 36–71.
182. Marques, H.M.C., 2010. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour Fragr. J.* 25, 313–326. doi:10.1002/ffj.2019
183. Marzoug, H.N. Ben, Romdhane, M., Lebrihi, A., Lebrihi, F., Couderc, F., Abderraba, M., Abderraba, M.L., Bouajila, J., 2011. *Eucalyptus oleosa* essential oils: Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the oils from different plant parts (stems, leaves, flowers and fruits). *Molecules* 16, 1695–1709. doi:10.3390/molecules16021695
184. Mastrangelo, G., Fadda, E., Marzia, V., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Occup. Heal. Ind. Med.* 3, 113.
185. 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 vesicular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115, 495–501.
186. Menhinick, E.F., 1964. A comparison of some species-individuals diversity indices applied to samples of field insects. *Ecology* 45, 859–861. doi:10.2307/1934933
187. Miguel, M.G., 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules* 15, 9252–9287. doi:10.3390/molecules15129252
188. Miller, R.M., Reinhardt, D.R., Jastrow, J.D., 1995. External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia* 103, 17–23.
189. Ministry of Industry, M., Association of Lebanese Industrialists, A., Investment Development Authority of Lebanon, I., Industrial Research Institute, I., 2016. The directory of exports and industrial firms in Lebanon, 9th ed. Industrial Directory CO.
190. Miransari, M., 2011. Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnol. Adv.* 29, 645–653. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.04.006
191. Mizushima, Y., Kobayashi, M., 1968. Interaction of anti-inflammatory drugs with

- serum proteins, especially with some biologically active proteins. *J. Pharm. Pharmacol.* 20, 169–173. doi:10.1111/j.2042-7158.1968.tb09718.x
192. Mohamed, A.A., Ali, S.I., El-Baz, F.K., 2013. Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts and Essential Oils of *Syzygium cumini* Leaves. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0060269
 193. Mohammadi, S., Aroiee, H., Aminifard, M.H., Jahanbakhsh, V., 2012. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against strawberry grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 45, 2474–2484. doi:10.1080/03235408.2012.729422
 194. Motamedi, J., Souri, M., 2016. Efficiency of numerical and parametrical indices to determine biodiversity in mountain rangelands. *Acta Ecol. Sin.* 36, 108–112. doi:10.1016/j.chnaes.2016.02.001
 195. Mouterde, P., 1983. *Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie. Tome III.* Editions de l'Imprimerie catholique.
 196. Mouterde, P., 1970. *Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie. Tome II.* Editions de l'Imprimerie catholique.
 197. Mouterde, P., 1966. *Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie. Tome I.* Editions de l'Imprimerie catholique.

N

198. Naidu, A.S., 2000. *Natural Food Antimicrobial Systems*, illustrate. ed. CRC Press, 2000.
199. Nash, J.F., Gettings, S.D., Diembeck, W., Chudowski, M., Kraus, A.L., 1996. A toxicological review of topical exposure to white mineral oils. *Food Chem. Toxicol.* 34, 213–225. doi:10.1016/0278-6915(95)00106-9
200. National Health and Medical Research Council, N., 1999. Toxicity assessment for carcinogenic soil contaminants.
201. Nehme, N., Haydar, C., Koubaissy, B., Fakh, M., Awad, S., Toufaily, J., Hamieh, T., 2014. Metal concentrations in river water and bed sediments of the Lower Litani River Basin, Council for Innovative Research. *J. Adv. Chem.* 8.
202. Nehme, N., Haydar, C., Koubaissy, B., Fakh, M., Awad, S., Toufaily, J., Villeras, F., Hamieh, T., 2014a. Study of the Correlation of the Physicochemical Characteristics of the Litani Lower River Basin. *Phys. Procedia* 55, 451–455. doi:10.1016/j.phpro.2014.07.065
203. Nehme, N., Haydar, C., Koubaissy, B., Fakh, M., Awad, S., Toufaily, J., Villeras, F., Hamieh, T., 2014b. The Distribution of Heavy Metals in the Lower River Basin, Lebanon. *Phys. Procedia* 55, 456–463. doi:10.1016/j.phpro.2014.07.066
204. Nwoko, C.O., 2014. Effect of Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi on the Physiological Performance of *Phaseolus vulgaris* Grown under Crude Oil Contaminated Soil. *J. Geosci. Environ. Prot.* 2, 9–14. doi:10.4236/gep.2014.24002

O

205. Oehl, F., Sieverding, E., Mäder, P., Dubois, D., Ineichen, K., Boller, T., Wiemken, A., 2004. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138, 574–583. doi:10.1007/s00442-003-1458-2
206. Olawoyin, R., Oyewole, S.A., Grayson, R.L., 2012. Potential risk effect from elevated levels of soil heavy metals on human health in the Niger delta. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 85, 120–130. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.08.004

207. Origo, N., Wicherek, S., Hotyat, M., 2012. Réhabilitation des sites pollués par phytoremédiation. [VertigO] La Rev. électronique en Sci. l'environnement électronique 12, None-None.
208. Orsini, L., Remy, J.C., 1976. Utilisation du chlorure de cobaltihexammine pour la détermination simultanée de la capacité d'échange et des bases échangeables des sols. *Sci. Sol* 4, 269–275.
209. Ouziad, F., Hildebrandt, U., Schmelzer, E., Bothe, H., 2005. Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* 162, 634–649. doi:10.1016/j.jplph.2004.09.014

P

210. Panagos, P., Hiederer, R., Van Liedekerke, M., Bampa, F., 2013. Review Article Contaminated Sites in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network. *J. Environ. Public Health* Article ID, 1–11. doi:DOI 10.1016/j.ecolind.2012.07.020
211. Pandey, V.C., Pandey, D.N., Singh, N., 2015. Sustainable phytoremediation based on naturally colonizing and economically valuable plants. *J. Clean. Prod.* 86, 37–39. doi:10.1016/j.jclepro.2014.08.030
212. Papachristos, D.P., Stamopoulos, D.C., 2002. Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stored Prod. Res.* 38, 117–128. doi:10.1016/S0022-474X(01)00007-8
213. Papuc, C., Goran, G. V., Predescu, C.N., Nicorescu, V., 2017. Mechanisms of Oxidative Processes in Meat and Toxicity Induced by Postprandial Degradation Products: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16, 96–123. doi:10.1111/1541-4337.12241
214. Parra, A., Zornoza, R., Conesa, E., Gómez-López, M.D., Faz, A., 2014. Seedling emergence, growth and trace elements tolerance and accumulation by Lamiaceae species in a mine soil. *Chemosphere* 113, 132–140. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.04.090
215. Patel, R.P., Singh, R., Rao, B.R.R., Singh, R.R., Srivastava, A., Lal, R.K., 2016. Differential response of genotype × environment on phenology, essential oil yield and quality of natural aroma chemicals of five *Ocimum* species. *Ind. Crops Prod.* 87, 210–217. doi:10.1016/j.indcrop.2016.04.001
216. Petriello, M.C., Hoffman, J.B., Sunkara, M., Wahlang, B., Perkins, J.T., Morris, A.J., Hennig, B., 2016. Dioxin-like pollutants increase hepatic flavin containing monooxygenase (FMO3) expression to promote synthesis of the pro-atherogenic nutrient biomarker trimethylamine N-oxide from dietary precursors. *J. Nutr. Biochem.* 33, 145–153. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.03.016
217. Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 158–160. doi:10.1016/S0007-1536(70)80110-3
218. Piao, X.L., Park, I.H., Baek, S.H., Kim, H.Y., Park, M.K., Park, J.H., 2004. Antioxidative activity of furanocoumarins isolated from *Angelica dahurica*. *J. Ethnopharmacol.* 93, 243–246. doi:10.1016/j.jep.2004.03.054
219. Polatoğlu, K., Karakoç, Ö.C., Yücel, Y.Y., Gücel, S., Demirci, B., Demirci, F., Başer, K.H.C., 2017. Insecticidal activity of *Salvia veneris* Hedge. Essential oil against coleopteran stored product insects and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera). *Ind. Crops Prod.* 97, 93–100. doi:10.1016/J.INDCROP.2016.12.012
220. Prakash, D., Singh, B.N., Upadhyay, G., 2007. Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). *Food Chem.* 102, 1389–1393.

doi:10.1016/j.foodchem.2006.06.063

Q

221. Qin, H., Brookes, P.C., Xu, J., 2016. Arbuscular Mycorrhizal Fungal Hyphae Alter Soil Bacterial Community and Enhance Polychlorinated Biphenyls Dissipation. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00939
222. Quiroga, E.N., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A., 2001. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 74, 89–96. doi:10.1016/S0378-8741(00)00350-0

R

223. Rabie, G.H., 2005. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Phytoremediation of Soil Rhizosphere Spiked with Poly Aromatic Hydrocarbons. *Mycobiology* 33, 41. doi:10.4489/MYCO.2005.33.1.041
224. Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., Banat, I.M., 2003. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour. Technol.* 90, 159–168. doi:10.1016/S0960-8524(03)00114-7
225. Ramadass, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., 2016. Soil bacterial strains with heavy metal resistance and high potential in degrading diesel oil and n-alkanes. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 13, 2863–2874. doi:https://doi.org/10.1007/s13762-016-1113-1
226. Raut, J.S., Karuppayil, S.M., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind. Crops Prod.* 62, 250–264. doi:10.1016/j.indcrop.2014.05.055
227. Reinhardt, D., 2007. Programming good relations - development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 98–105. doi:10.1016/j.pbi.2006.11.001
228. Requena, N., Serrano, E., Ocón, A., Breuninger, M., 2007. Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* 68, 33–40. doi:10.1016/j.phytochem.2006.09.036
229. Reshma, Arun, K.P., Brindha, P., 2014. In vitro anti-inflammatory, Antioxidant and nephroprotective studies on leaves of *Aegle marmelos* and *Ocimum sanctum*. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 7, 121–129.
230. Rojo, F., 2009. Degradation of alkanes by bacteria: Minireview. *Environ. Microbiol.* 11, 2477–2490. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x
231. Ruby, M. V., Schoof, R., Brattin, W., Goldade, M., Post, G., Harnois, M., Mosby, D.E., Casteel, W., Berti, W., Carpenter, M., Edwards, D., Cragin, D., Chappell, W.R., 1999. Advances in evaluation the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3697–3705. doi:10.1021/es990479z
232. Ruiz-Lozano, J.M., Azcon, R., Gomez, M., 1995. Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 456–460.
233. Rydlová, J., Jelínková, M., Dušek, K., Dušková, E., Vosátka, M., Püschel, D., 2016. Arbuscular mycorrhiza differentially affects synthesis of essential oils in coriander and dill. *Mycorrhiza* 26, 123–131. doi:https://doi.org/10.1007/s00572-015-0652-5

S

234. Sakat, S.S., Juvekar, A.R., Gambhire, M.N., 2010. In-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* linn. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2, 146–155.
235. Sánchez-Sampedro, M.A., Fernández-Tárrago, J., Corchete, P., 2005. Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *J. Biotechnol.* 119, 60–69. doi:10.1016/J.JBIOTEC.2005.06.012
236. Samanta, S.K., Singh, O. V., Jain, R.K., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20, 243–248. doi:10.1016/S0167-7799(02)01943-1
237. Sancholle, M., Dalpé, Y., Grandmougin-Ferjani, A., 2001. Lipids of mycorrhizae., in: Esser, K., Hock, B. (Eds.), *The Mycota IX. Fungal Association*. pp. 63–93.
238. Sas-Nowosielska, A., Kucharski, R., Malkowski, E., Pogrzeba, M., Kuperberg, J.M., Krynski, K., 2004. Phytoextraction crop disposal — an unsolved problem. *Environ. Pollut.* 128, 373–379. doi:10.1016/j.envpol.2003.09.012
239. Schreiner, R.P., Bethlenfalvay, G.J., 1995. Mycorrhizal interactions in sustainable agriculture. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15, 271–285.
240. Schützendübel, A., Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53, 1351–1365. doi:10.1016/S0981-9428(02)01411-0
241. Segura, A., Rodríguez-Conde, S., Ramos, C., Ramos, J.L., 2009. Bacterial responses and interactions with plants during rhizoremediation. *Microb. Biotechnol.* 2, 452–64. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00113.x
242. Shalufa Assani, N., Robbrecht, E., Katusi Lomalisa, R., Nshimba Seya Wa Malale, H., Ntahobavuka Habimana, H., Mangambu Mokoso, J.D., 2014. Structure, dispersion spatiale et abondance de la population à *Guarea thompsonii* Sprague et Hutch. (Meliaceae) dans la forêt à *Scorodophloeus zenkeri* Harms (Fabaceae) dans la Réserve Forestière de la Yoko en R.D.Congo. *J. Anim. Plant Sci.* 23, 3569–3585.
243. Shannon, C.E., 1948. A Mathematical Theory of Communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27, 379–423.
244. Shannon, C.E., Weaver, W., 1964. *The Mathematical Theory of Communication*. Univ. Illinois Press. Urban.
245. Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163, 688.
246. Smith, S.E., Read, D.J., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd ed. Academic Press.
247. Smith, S.E., Smith, F.A., 2011. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 227–250. doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103846
248. Song, F.Q., Kong, X.S., 2012. Molecular process of arbuscular mycorrhizal associations and the symbiotic stabilizing mechanisms. *African J. Microbiol. Res.* 6, 870–880. doi:10.5897/AJMR-11-1383
249. St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M., Fortin, J.A., 1995. Endomycorrhizes VA et sensibilité des plantes aux maladies: synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels. *La symbiose mycorrhizienne état des connaissances*. Orb. Publ. Frelighsburg, Quebec, Canada 51–87.
250. Stephenson, G.L., Kuperman, R.G., Linder, G.L., Visser, S., 2002. Toxicity tests for assessing contaminated soils and ground water. In: (Eds.), in: Sunahara, G.I., Renoux, A.Y., Thellen, C., Gaudet, C.L., Pilon, A. (Eds.), *Environmental Analysis of Contaminated Sites*. Wiley, New York, pp. 25–43.

251. Sýkorová, Z., Ineichen, K., Wiemken, A., Redecker, D., 2007. The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza* 18, 1–14. doi:10.1007/s00572-007-0147-0
252. Szente, L., Szejtli, J., 2004. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 137–142. doi:10.1016/j.tifs.2003.09.019

T

253. Tang, M., Chen, H., Huang, J.C., Tian, Z.Q., 2009. AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil Biol. Biochem.* 41, 936–940. doi:10.1016/j.soilbio.2008.11.007
254. Tarraf, W., Ruta, C., Tagarelli, A., De Cillis, F., De Mastro, G., 2017. Influence of arbuscular mycorrhizae on plant growth, essential oil production and phosphorus uptake of *Salvia officinalis* L. *Ind. Crops Prod.* 102, 144–153. doi:10.1016/j.indcrop.2017.03.010
255. Tawaraya, K., Watanabe, S., Vierheilig, H., Wagatsuma, T., 2007. Formation of appressoria by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* on roots of *Allium cepa* is linked with root age. *Mycoscience* 48, 305–308. doi:10.1007/s10267-007-0367-3
256. Taylor, M.P., Mackay, A.K., Hudson-Edwards, K.A., Holz, E., 2010. Soil Cd, Cu, Pb and Zn contaminants around Mount Isa city, Queensland, Australia: Potential sources and risks to human health. *Appl. Geochemistry* 25, 841–855. doi:10.1016/j.apgeochem.2010.03.003
257. Thavamani, P., Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R., 2012. Microbial activity and diversity in long-term mixed contaminated soils with respect to polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals. *J. Environ. Manage.* 99, 10–17. doi:10.1016/j.jenvman.2011.12.030
258. Thomidis, T., Filotheou, A., 2016. Evaluation of five essential oils as bio-fungicides on the control of *Pilidiella granati* rot in pomegranate. *Crop Prot.* 89, 66–71. doi:10.1016/j.cropro.2016.07.002
259. Tisdall, J.M., 1994. Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant Soil* 159, 115–121.
260. Tisdall, J.M., 1991. Fungal hyphae and structural stability of soil. *Aust. J. Soil Res.* 29, 729–743.
261. Tissut, M., Raveton, M., Ravanel, P., 2006. Ecoremediation. Cooperation between plants and soil microorganisms, molecular aspects and limits, in: *Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation*. Springer, Dordrecht, pp. 489–504. doi:10.1007/978-1-4020-4728-2_32
262. Toljander, J., Lindahl, B., Paul, L., Elfstrand, M., Finlay, R., 2007. Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61, 295–304.
263. Tongnuanchan, P., Benjakul, S., 2014. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *J. Food Sci.* 79, 1231–1249. doi:10.1111/1750-3841.12492

U

264. US Environmental Protection Agency, 2004. Risk assessment guidance for superfund (RAGS). Volume I. Human health evaluation manual (HHEM). Part E. Supplemental guidance for dermal risk assessment, Office of Superfund Remediation and Technology

- Innovation U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
265. US Environmental Protection Agency, E.R.L., 2007. method 8290A: Polychlorinated dibenzodioxins and polychlorinated dibenzofurans by high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry.
 266. US Environmental Protection Agency, E.R.L., 1989. Ecological Assessment of Hazardous Waste Sites : A Field and Laboratory. Washington, DC 20460.
 267. USAID, 2014. Litani River Basin Management Support Program - Action plan for water resources awareness and enforcement.
 268. USAID, 2012a. Litani River basin management plan - Volume I : Current Situation.
 269. USAID, 2012b. Litani River Basin Management Support Program - Feasibility Study for Constructed Wetlands in the Litani River Basin.
 270. USAID, 2011a. Litani River Basin Management Support Program- Water Quality Survey - Dry Season (Summer 2010).
 271. USAID, 2011b. Litani River Basin Management Support Program-Water Quality Survey-Dry Season Volume II-Appendices.
 272. USDA, 1999. Soil Taxonomy. A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys, Second Edi. ed. Soil Survey Staff, Washington, DC.

V

273. Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N., Peterson, R.E., 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.* 93, 223–241. doi:10.1093/toxsci/kfl055.
274. Van Der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Chaney, R.L., Anderson, C.W.N., Meech, J.A., Erskine, P.D., Simonnot, M.O., Vaughan, J., Morel, J.L., Echevarria, G., Fogliani, B., Rongliang, Q., Mulligan, D.R., 2015. Agromining: Farming for metals in the future? *Environ. Sci. Technol.* 49, 4773–4780. doi:10.1021/es506031u
275. Verdin, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Fontaine, J., Grandmougin-Ferjani, A., Durand, R., 2006. Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza* 16, 397–405. doi:10.1007/s00572-006-0055-8.
276. Verma, S.K., Singh, K., Gupta, A.K., Pandey, V.C., Trivedi, P., Verma, R.K., Patra, D.D., 2014. Aromatic grasses for phytomanagement of coal fly ash hazards. *Ecol. Eng.* 73, 425–428. doi:https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.106

W

277. Wagacha, J.M., Muthomi, J.W., 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Prot.* 26, 877–885. doi:10.1016/j.cropro.2006.09.003
278. Wagan, T.A., He, Y., Cai, W., Zhao, J., Hua, H., 2016. Fumigant and Contact Toxicity and Oviposition Deterrent Effects of Plant Essential Oils on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Florida Entomol.* 99, 673–677. doi:https://doi.org/10.1653/024.099.0414
279. Walter, J.-M.N., 2006. Méthode du relevé Floristique : Introduction (Première et Deuxième partie), in: *Méthodes d'Etude de La Végétation*. pp. 1–23.

280. Wang, J., Zhu, F., Zhou, X.M., Niu, C.Y., Lei, C.L., 2006. Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Stored Prod. Res.* 42, 339–347. doi:10.1016/J.JSPR.2005.06.001
281. Wang, W., Shao, Z., 2013. Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation. *Front. Microbiol.* 4, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2013.00116
282. Whipps, J.M., 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can. J. Bot.* 82, 1198–1227.
283. White Jr, K.L., 1986. An overview of immunotoxicology and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Environ. Sci. Heal. Part C* 4, 163–202. doi:10.1080/10590508609373342
284. Wojtera-Kwiczor, J., Żukowska, W., Graj, W., Małecka, A., Piechalak, A., Ciszewska, L., Chrzanowski, Ł., Lisiecki, P., Komorowicz, I., Barańkiewicz, D., Voss, I., Scheibe, R., Tomaszewska, B., 2014. Rhizoremediation of Diesel-Contaminated Soil with Two Rapeseed Varieties and Petroleum degraders Reveals Different Responses of the Plant Defense Mechanisms. *Int. J. Phytoremediation* 16, 770–789. doi:10.1080/15226514.2013.856848
285. Wright, S.F., Upadhyaya, A., 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 198, 97–107.
286. Wu, F.Y., Yu, X.Z., Wu, S.C., Lin, X.G., Wong, M.H., 2011. Phenanthrene and pyrene uptake by arbuscular mycorrhizal maize and their dissipation in soil. *J. Hazard. Mater.* 187, 341–347. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.01.024

X

287. Xiong, Z.T., Hu, H.X., Wang, Y.X., Fu, G.H., Tan, Z.Q., Yan, G.A., 1997. Comparative analyses of soil contaminant levels and plant species diversity at developing and disused oil well sites in Qianjiang oilfield, China. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 667–672. doi:10.1007/s001289900385

Y

288. Yadav, S.K., 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African J. Bot.* 76, 167–179. doi:10.1016/j.sajb.2009.10.007
289. Yan-hui, X., Jin-ming, H., Chun-xiang, P., Zhen-ming, Z., Qi-rui, L., Gui-lin, Z., 2014. Effects of Zn concentration on Zn accumulation and essential oil components in fennel(*Foeniculum vulgare* Mill.) plant. *Guangdong Agric. Sci.* 9.
290. Yang, B., Zhou, M., Shu, W.S., Lan, C.Y., Ye, Z.H., Qiu, R.L., Jie, Y.C., Cui, G.X., Wong, M., 2010. Constitutional tolerance to heavy metals of a fiber crop, ramie (*Boehmeria nivea*), and its potential usage. *Environ. Pollut.* 158, 551–558. doi:10.1016/J.ENVPOL.2009.08.043
291. Yang, Y., Song, Y., Scheller, H. V., Ghosh, A., Ban, Y., Chen, H., Tang, M., 2015. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Robinia pseudoacacia* in uncontaminated and heavy metal contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* 86, 146–158. doi:10.1016/j.soilbio.2015.03.018
292. Ye, C.-L., Dai, D.-H., Hu, W.-L., 2013. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). *Food Control* 30, 48–53.

- doi:10.1016/j.foodcont.2012.07.033
293. Ye, Z.W., Zhang, J., Townsend, D.M., Tew, K.D., 2015. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1850, 1607–1621. doi:10.1016/j.bbagen.2014.11.010
 294. Yorgancioglu, A., Bayramoglu, E.E., 2013. Production of cosmetic purpose collagen containing antimicrobial emulsion with certain essential oils. *Ind. Crop. Prod.* 44, 378–382. doi:10.1016/j.indcrop.2012.11.013
 295. You, C.X., Zhang, W.J., Guo, S.S., Wang, C.F., Yang, K., Liang, J.Y., Wang, Y., Geng, Z.F., Du, S.S., Deng, Z.W., 2015. Chemical composition of essential oils extracted from six *Murraya* species and their repellent activity against *Tribolium castaneum*. *Ind. Crops Prod.* 76, 681–687. doi:10.1016/J.INDCROP.2015.07.044
 296. Youssef, L., Younes, G., Kouzayha, A., Jaber, F., 2015. Occurrence and levels of pesticides in South Lebanon water. *Chem. Speciat. Bioavailab.* 27, 62–70. doi:10.1080/09542299.2015.1023092
 297. Yu, X.Z., Wu, S.C., Wu, F.Y., Wong, M.H., 2011. Enhanced dissipation of PAHs from soil using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. *J. Hazard. Mater.* 186, 1206–1217. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.11.116

Z

298. Zangaro, W., Rostiola, L.V., Carrenho, P.B. de S., Alves, R. de A., Lescano, L.E.A.M., Rondina, A.B.L., Nogueira, M.A., Carrenho, R., 2013. Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. *Mycorrhiza* 23, 221–233. doi:10.1007/s00572-012-0464-9
299. Zelles, L., Bai, Q.Y., 1993. Fractionation of Fatty Acids Derived from Soil Lipids by Solid Phase Extraction and their Quantitative Analysis by GC-MS. *Soil Biol. Biochem.* 25, 495–507. doi:10.1016/0038-0717(93)90075-M
300. Zeng, Y., Guo, L.-P., Chen, B.-D., Hao, Z.-P., Wang, J.-Y., Huang, L.-Q., Yang, G., Cui, X.-M., Yang, L., Wu, Z.-X., Chen, M.-L., Zhang, Y., 2013. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and active ingredients of medicinal plants: current research status and perspectives. *Mycorrhiza* 23, 253–265. doi:10.1007/s00572-013-0484-0
301. Zgheib, R., Chaillou, S., Ouaini, N., Kassouf, A., Rutledge, D., El Azzi, D., El Beyrouthy, M., 2016. Chemometric tools to highlight the variability of the chemical composition and yield of Lebanese *Origanum syriacum* L. essential oil depending on harvesting time, geographical location and drying methods. *Chem. Biodivers.* 13, 1326–1347. doi:10.1002/cbdv.201600061
302. 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. *J. Heal. Sci.* 56, 257–266. doi:10.1248/jhs.56.257
303. Zhang, X., Ren, B.-H., Wu, S.-L., Sun, Y.-Q., Lin, G., Chen, B.-D., 2015. Arbuscular mycorrhizal symbiosis influences arsenic accumulation and speciation in *Medicago truncatula* L. in arsenic-contaminated soil. *Chemosphere* 119, 224–230. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.06.042
304. Zheljazkov, V.D., Craker, L.E., Xing, B., 2006. Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil. *Environ. Exp. Bot.* 58, 9–16.
305. Zheljazkov, V.D., Jeliakova, E.A., Kovacheva, N., Dzhurmanski, A., 2008. Metal uptake by medicinal plant species grown in soils contaminated by a smelter 64, 207–216.

Références bibliographiques

- doi:10.1016/j.envexpbot.2008.07.003
306. Zheljazkov, V.D., Nielsen, N.E., 1996. Effect of heavy metals on peppermint and cornmint. *Plant Soil* 178, 59–66. doi:10.1007/BF00011163
307. 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.

Annexe

Liste des valorisations scientifiques

Publications :

- Article 1 : Imad El-Alam, Anthony Verdin, Joël Fontaine, Frédéric Laruelle, Ramez Chahine, Hassane Makhoulf, Anissa Lounès-Hadj Sahraoui « Ecotoxicity evaluation and human risk assessment of an agricultural polluted soil » (soumis dans Environmental Monitoring and Assessment).
- Article 2 : Imad El-Alam, Raviella Zgheib, Marc El Beyrouthy, Anthony Verdin, Joël Fontaine, Ramez Chahine, Hassane Makhoulf, Anissa Lounès-Hadj Sahraoui « Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoremediation by *Origanum syriacum*: efficiency and impact on essential oil composition » (soumis dans Chemosphere).
- Article 3 : Imad El-Alam, Anthony Verdin, Joël Fontaine, Natacha Bourdon, Sophie Fourmentin, Ramez Chahine, Hassane Makhoulf, Anissa Lounès-Hadj Sahraoui « Screening biological activities of essential oils: antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities » (soumis dans Pharmaceutical Biology).

Communications Orales :

- LAAS 2017 (The Lebanese Association for Advanced Sciences): Imad El-Alam, A. Verdin, J. Fontaine, N. Bourdon, S. Fourmentin, R. Chahine, H. Makhoulf, A. Lounès-Hadj Sahraoui. Essential oils: natural and eco-friendly potential fungicides to fight against *Fusarium culmorum*, LAAS 2017, Fanar-Liban, 6-7 Avril 2017.
- Séminaire des doctorants UCEIV 2017: Imad El-Alam, A. Verdin, J. Fontaine, R. Chahine, H. Makhoulf, A. Lounès-Hadj Sahraoui. Characterization of chemical pollution, eco/toxicity assessment and production of essential oils from plant biomass produced on a soil of the Bekaa (Lebanon). Calais-France, 8 Mars 2017.
- SFRCondorcet 2017: Imad El-Alam, A. Verdin, J. Fontaine, R. Chahine, H. Makhoulf, A. Lounès-Hadj Sahraoui. Soil Chemical pollution, human risk assessment and ecotoxicity evaluation. Amiens-France, 19-20 Janvier 2017.
- PHYTOTECH 2016 (the 13th International Phytotechnology Conference): Imad El-Alam, A. Verdin, J. Fontaine, R. Chahine, H. Makhoulf, A. Lounès-Hadj Sahraoui. Agricultural soil pollution monitoring using ecotoxicological and toxicological biomarkers. PHYTOTECH 2016, Hangzhou-Chine, 26-29 Septembre 2016.

- Intersol 2016 (International Conference-Exhibition on Soils, Sediments and Water): Imad El-Alam, A. Verdin, J. Fontaine, R. Chahine, H. Makhlouf, A. Lounès-Hadj Sahraoui. Characterization of the pollution, toxicity and ecotoxicity of a soil contaminated by the Litani river, Bekaa (Lebanon). Intersol 2016, Lille-France, 16-17 Mars 2016

Posters :

- Colloque International Francophone en Environnement et en Santé. Imad El-Alam, A. Verdin, J. Fontaine, R. Chahine, H. Makhlouf, A. Lounès-Hadj Sahraoui. Evaluation de la *pollution, de la toxicité et de l'écotoxicité d'un sol agricole de la Bekaa au Liban*. Dunkerque-France, 23-25 Octobre 2017.
- SOILREM 2016 (5th International Conference on Soil Pollution and Remediation): Imad El-Alam, A. Verdin, J. Fontaine, R. Chahine, H. Makhlouf, A. Lounès-Hadj Sahraoui. Impact of hydrocarbon pollution on the soil microbiota. SOILREM 2016, Hangzhou-Chine, 24-26 Septembre 2016.
- PHYTOTECH 2016 (the 13th International Phytotechnology Conference): Imad El-Alam, A. Verdin, J. Fontaine, R. Chahine, H. Makhlouf, A. Lounès-Hadj Sahraoui Human risk assessment and ecotoxicity evaluation of a polluted soil in the Bekaa (Lebanon). PHYTOTECH 2016, Hangzhou-Chine, 26-29 Septembre 2016.
- SFR Condorcet 2016: Imad El-Alam, A. Verdin, J. Fontaine, R. Chahine, H. Makhlouf, A. Lounès-Hadj Sahraoui. Evaluation de la contamination, du risque de toxicité et d'*écotoxicité d'un sol agricole de la Bekaa (Liban), irrigué par l'eau du Litani*. SFR Condorcet 2016, Gembloux-Belgique, 05-06 Juillet 2016.
- LAAS 2016 (The Lebanese Association for Advanced Sciences): Imad El-Alam, A. Verdin, J. Fontaine, R. Chahine, H. Makhlouf, A. Lounès-Hadj Sahraoui. Evaluation of pollution, toxicity and ecotoxicity of a soil in the Bekaa (Lebanon), irrigated by Litani river. LAAS 2016, Beyrouth-Liban, 14-15 Avril 2016.
- JFL3 2015 (Les Troisièmes Journées Franco-Libanaises): Imad El-Alam, A. Verdin, J. Fontaine, R. Chahine, H. Makhlouf, A. Lounès-Hadj Sahraoui. Caractérisation de la *pollution et de la diversité microbienne et végétale d'un sol de la Bekaa (Liban), contaminé par l'eau du Litani*. JFL3 2015, Beyrouth-Liban, 29-30 Octobre 2015.
- LAAS 2015 (The Lebanese Association for Advanced Sciences): Imad El-Alam, A. Verdin, J. Fontaine, R. Chahine, H. Makhlouf, A. Lounès-Hadj Sahraoui. Caractérisation de la *pollution du sol d'une parcelle de la Bekaa (Liban) : essai de phytoremédiation assistée par les champignons mycorhiziens*, LAAS 2015, Beyrouth-Liban, 15-17 Avril 2015.

Résumé

Phytoremédiation d'un sol contaminé de la Bekaa (Liban) : valorisation de la biomasse par production d'huiles essentielles à activités biologiques

Situé au sein de la plaine de la Bekaa au Liban, le fleuve du Litani est sujet à divers rejets agricoles, industriels, domestiques et urbain. Lors de l'irrigation des parcelles agricoles, les eaux du fleuve contaminent le sol et les cultures présentant ainsi un risque pour la santé de l'Homme et l'environnement. Parmi les méthodes de remédiation émergentes et en adéquation avec le développement durable figure la phytoremédiation assistée par les champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA). Cependant, la rentabilité de ce mode de gestion constitue l'un des principaux freins à son développement et la valorisation de produits biosourcés, à hautes valeurs ajoutées, issus de la biomasse végétale produite sur ces sols contaminés permettrait d'abaisser les coûts globaux de gestion et de requalification de ces sols pollués. Parmi les filières de valorisation éco-innovantes, la culture de plantes à parfums aromatiques et médicinales (PPAM) productrices d'huiles essentielles (HE) à activités biologiques peut être suggérée comme une option prometteuse. Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse a consisté tout d'abord à caractériser le sol d'une parcelle expérimentale située à Marj-Bekaa et directement irriguée par les eaux du Litani, puis à proposer un mode de gestion basé sur la production d'HE pouvant répondre ainsi aux attentes environnementales, économiques et sociales.

Nos résultats montrent que la parcelle expérimentale, située à Marj-Bekaa et directement irriguée par les eaux du Litani, est principalement contaminée par des éléments traces métalliques [Ni (88 mg.Kg⁻¹), Cr (122 mg.Kg⁻¹), V (170 mg.Kg⁻¹) et Mn (551 mg.Kg⁻¹)] et des polluants organiques [les alcanes (2.5 g.Kg⁻¹ du sol)]. Cette contamination est à l'origine d'une (1) cytotoxicité vis-à-vis des cellules pulmonaires et hépatiques mise en évidence grâce au dosage de deux activités enzymatiques, la lactate déshydrogénase et la déshydrogénase mitochondriale mais aussi d'une (2) écotoxicité révélée par la réduction (i) des taux de germination des graines (blé, trèfle, luzerne, ray-grass et fétuque), (ii) de la biomasse microbienne du sol [bactéries Gram-positive et Gram-négative, champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA), champignons saprotrophes et ectomycorhiziens], (iii) de l'abondance et de la diversité des spores de CMA et (iv) de la richesse et de la diversité végétales. Cependant, toutes les plantes indigènes étaient mycorhizées. C'est pourquoi, la faisabilité de la phytoremédiation assistée par les CMA du site expérimental de la Bekaa, a été testée à la fois en microcosmes et in situ en utilisant une plante aromatique productrice d'HE, l'origan (*Origanum syriacum* L.). Nos résultats ont montré que non seulement l'origan possède un potentiel de dissipation des alcanes mais en plus cette plante ne transfère pas ces polluants dans les HE extraites à partir de sa biomasse aérienne. Par ailleurs, il a été constaté que la mycorhization a une influence sur la composition des HE. En outre, notre étude a permis l'évaluation de diverses activités biologiques (antifongique, antioxydante et anti-inflammatoire) d'une gamme d'HE extraites de différentes espèces végétales dont l'origan et ce en présence et en absence des cyclodextrines (HP- β -CD), oligosaccharides cycliques qui complexent les HE et augmentent leurs biodisponibilités.

Mots-clés : pollution du sol - toxicité - écotoxicité - *Origanum syriacum* - champignons mycorhiziens à arbuscules - phytoremédiation - huiles essentielles - activités biologiques

Abstract

Phytoremediation of a polluted soil in the Bekaa valley (Lebanon): valorization of the biomass by producing essential oil with biological activities

Located in the Bekaa valley in Lebanon, the Litani River is exposed to agricultural, industrial, domestic and urban wastewaters. Through the irrigation of agricultural soils, the river's water contributes to soil and culture contamination and represents a risk for human health and environment. Amongst the emergent sustainable remediation methods, there is arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) assisted-phytoremediation. However, one of the limitation in using phytoremediation as depollution method is its socio-economic profitability. Among the eco-innovative valorization processes with high profitability, the cultivation of aromatic and medicinal plants producing essential oils (EO) with biological activities has been suggested as a promising option. Thus, this thesis work aims firstly at characterizing the soil of an experimental site located at Marj-Bekaa and directly irrigated by the Litani's water and secondly at proposing a mode of management of the contaminated soil based on the production of EO that can meet environmental, economic and social expectations.

Our findings showed that the soil sampled in Marj-Bekaa is mainly contaminated by metal trace elements [Ni (88 mg.Kg⁻¹), Cr (122 mg.Kg⁻¹), V (170 mg.Kg⁻¹) and Mn (551 mg.Kg⁻¹)] and alkanes (2.5 g.Kg⁻¹ of soil). This contamination is causing (i) cytotoxicity against both bronchial and hepatic human cells revealed by the evaluation of two enzyme activities, extracellular lactate dehydrogenase and mitochondrial dehydrogenase, as well as (2) ecotoxicity pointed out by the reduction of (i) seed germination (wheat, clover, alfalfa, ryegrass and tall fescue), (ii) soil microbial biomass [Gram-positive and Gram-negative bacteria, arbuscular mycorrhizal fungal (AMF), ectomycorrhizal and saprotrophic fungi], (iii) abundance and diversity of AMF spores as well as (iv) the plant diversity and richness.

The AMF-assisted phytoremediation of the Bekaa experimental site was evaluated both in microcosms and in in situ experiments using an aromatic plant producing EO, oregano (*Origanum syriacum* L.). Our results revealed that oregano plants possess an alkane's dissipation potential and no pollutant transfer is detected in EO. Moreover, the mycorrhization modified the EO composition.

On the other hand, our study evaluated several biological (antifungal, antioxidant and anti-inflammatory) activities of a range of EO extracted from many plant species including oregano, in the presence and the absence of cyclodextrines (HP- β -CD), cyclic oligosaccharides that encapsulate EO and enhance their bioavailabilities.

Keywords: soil pollution - toxicity - ecotoxicity - *Origanum syriacum* - arbuscular mycorrhizal fungi - phytoremediation - essential oils - biological activities