



**HAL**  
open science

# Réhabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus X giganteus*

Didier Técher

► **To cite this version:**

Didier Técher. Réhabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus X giganteus*. Ecotoxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2011. Français. NNT : 2011METZ047S . tel-01749177

**HAL Id: tel-01749177**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749177v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

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

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



A D E M E



Thèse Présentée en vue de l'obtention du

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PAUL VERLAINE DE METZ**

**DISCIPLINE : TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT**

Soutenue publiquement le 16 juin 2011

***REHABILITATION DE SOLS POLLUES PAR DES HAP GRACE  
AUX BACTERIES ASSOCIEES A LA RHIZOSPHERE DE  
MISCANTHUS X GIGANTEUS***

**Didier Técher**

**ECOLE DOCTORALE RESSOURCES PROCEDES PRODUITS ENVIRONNEMENT**

**Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes**

**CNRS UMR 7146**

*Devant le Jury d'examen composé de :*

**M. Stéphane Vuilleumier**, Professeur, Université de Strasbourg (Président et Rapporteur)

**Mme Anne-Catherine Schmit**, Professeur, Université de Strasbourg (Rapporteur)

**M. Jaïro Falla**, Professeur, Université Paul Verlaine de Metz (Directeur de thèse)

**M. Philippe Laval-Gilly**, Maître de Conférences, Université de Metz (Co-encadrant de thèse)

**M. René Gruber**, Professeur, Université de Metz

**Mme Frédérique Cadière**, Ingénieur ADEME

**M. Yves LE CORFEC**, Ingénieur EDF représenté par **Mme Sandrine MULARONI**,

Ingénieur EDF

*A ma Famille,  
Loin des yeux mais non loin du  
cœur,*

*A Ceux qui sont partis...*

*A Hayete...*

*Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail.*

Je remercie particulièrement les Professeurs Anne-Catherine Schmit et Stéphane Vuilleumier pour avoir accepté d'analyser ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie le directeur de thèse, le Professeur Jairo Falla, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et permis de réaliser mon travail dans une grande liberté de pensée et de recherche durant ces années. Merci également au co-encadrant de thèse, le Docteur Philippe Laval-Gilly, pour les diverses suggestions de corrections concernant les rapports d'avancement, la préparation des oraux et thèse.

Je remercie également l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) pour avoir participé au financement de cette thèse, et Madame Frédérique Cadière, ingénieure à l'ADEME, pour le suivi régulier de l'avancement des travaux relatifs à la phytoremédiation des sols pollués par des HAP.

De même, j'adresse mes remerciements à Electricité De France (EDF) dans le cadre du partenariat « EDF – Université Paul Verlaine Metz » relatif au co-financement de la thèse, et à Monsieur Yves Le Corfec, ingénieur-chercheur pour le suivi régulier des travaux liés à la thématique de revégétalisation des cendres volantes.

Je tiens à remercier particulièrement le Professeur Madame Paule Vasseur, à qui je dois d'avoir pu poursuivre mes études en Master 2 Recherche puis en Doctorat, survolant ainsi les océans de La Réunion à Metz, en n'oubliant pas les mois de stage passés à Lille. J'adresse à ce sujet mes sincères remerciements au Docteur Sébastien Lemièrre pour m'avoir inculqué alors les bases fondamentales de la recherche scientifique, ce qui m'aura permis de mener à bien ce travail par la suite... mon parcours d'apprenti-chercheur, passant des moules et sédiments pollués par les métaux aux bactéries du sol dégradant les HAP et autres « subtilités végétales » n'en aura été que plus formateur finalement...

Je tiens à remercier très chaleureusement Mme Catherine Durandet, la meilleure des « techniciennes de laboratoire » (j'utilise des guillemets car ce n'est là qu'un grade administratif qui ne reflète aucunement tous les superlatifs dont on devrait user pour te remercier!), et le Docteur Amar Bennisroune, tous deux pour leur soutien et accompagnement moral sans pareil durant ces années !... aussi bien pour leur immense gentillesse que pour leurs qualités professionnelles.

Je tiens à remercier particulièrement Melle Marielle D'Innocenzo, ingénieure d'étude, pour son aide précieuse au cours de mes dernières expérimentations et ses encouragements. Tiens moi au courant si un jour tu tentes l'aventure, j'essaierai de t'aider à mon tour.

Je tiens aussi à remercier le Docteur Laurent Foucaud pour sa grande compréhension et sympathie à mon égard, ainsi que pour son aide précieuse pour ma première publication avant son départ pour d'autres cieux universitaires...

Merci également au Docteur Sonia Henry pour les suggestions de corrections qu'elle a apportées à mon manuscrit.

Mon attention se reporte aussi sur le « Department of Chemistry and Biochemistry and Department of Geology and Pedology, Mendel University of Agriculture and Forestry » de Brno, (Czech Republic) (Dr R. Klement) et en particulier le Docteur Pavel Formanek, ainsi que sur le Laboratoire de Chimie et de Méthodologies pour l'Environnement (LCME- Metz, France) du Professeur Amadou Dicko et en particulier François Muanda Nsemi pour leurs collaborations concernant les aspects analytiques des exsudats de MxG. Pavel, I wish I could come and give you a special French wine in Brno too, one day... François, j'espère que les vents t'ont mené à « bon port » depuis ta soutenance...

Je remercie également Mr François Griffaton et Melle Emilie Charrue du Lycée Agricole de Metz - Courcelles Chaussy pour leur sympathie et leur aide technique dans la plantation en champ, en particulier au niveau du parc à cendres.

Merci aussi aux autres non moins super techniciennes Sabrina Bostelle et plus récemment Aynur Dagtekin pour leur sympathie, leur grande gentillesse et disponibilité lorsque nécessaire.

Je remercie aussi Thérèse Wallon (Cégep Levis-Lauzon) que j'ai eu la chance de co-encadrer, pour son aide précieuse avec les bactéries, dommage que ton stage n'eut pas été plus long à cette époque là. En espérant aussi que les vents t'ont porté à « bon port » depuis...

*Merci enfin à toute l'équipe du département Génie Biologique de l'IUT de Thionville Yutz, pour les nombreux aides et conseils fournis (je pense en particulier à Mr Picquot (Pascal), Michael (Schneider), Franck (Mouillebouche), Mr Philippe Arnoux, Mr Quignon), ainsi que pour leur sympathie et le grand sens de l'humour de certains, me distrayant à des moments plus que bienvenus... (je ne suis pas prêt de vous oublier, hein Michael!?... quoique Franck, il faudrait que je songe à me mettre aussi au montage photo...)*

*Merci en particulier à Amar, Michael et Pascal encore une fois pour leur aide lors de cette répétition d'oral de thèse jusqu'à pas d'heure... Je me serais fait, j'en suis certain, quelques véritables amis aussi bien en recherche qu'en « pédagogie »...*

*Un grand merci enfin à Angie Patricia Molina Delgado et Laura Rojas (« cheer up »), Gehan Sultan, Stéphane Goulaouic, ainsi qu'à Cathy Gruber, Nicolas Couleau alias « Mister Pas de souci », amis « thésards », stagiaires de master, amis tout court, ATER de passage (Sophie, Perrine, Jaouad, Jérôme), le Docteur Anne Maeder, Ghislaine et le Professeur François Xavier Royer pour leurs petits mots et encouragements ça et là... les étudiants du projet tutoré (Caroline, Mélanie, Joffrey, Olivier, Nicolas), à Pangbo! (le malin...) également à Claudia (bonne chance et courage aussi pour la fin de ta thèse, tu tiens le bon bout!), et à Vanessa pour les encouragements à la croisée des couloirs, un peu étonnée parfois de me voir encore là à ces heures de nettoyage du bâtiment.*

*Un grand salut et remerciement aussi au personnel du resto U, à Mireille notamment, pour leur sympathie à mon égard et les petits privilèges gustatifs qui m'auront vraiment touché!*

*Un merci spécial aux « gars la cour qui se reconnaîtront si un deux i passe par là un jour riscape »... « ça a nou ça »... .*

*Je n'aurai de cesse de remercier mes Parents, mon Frère, ma Famille, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible, ainsi que Celle qui partage ma vie depuis peu....*

## LISTE DES COMMUNICATIONS LIEES A CE TRAVAIL

### Publications dans des revues internationales avec comité de lecture

**Técher D., Laval-Gilly P., Henry S., Bennasroune A., Martinez-Chois C., D'Innocenzo M. & Falla J.** (2012a). Prospects of *Miscanthus x giganteus* for PAH phytoremediation: a microcosm study; *Industrial Crops and Products*, **36** (1), 276-281.

**Técher D., Laval-Gilly P., Bennasroune A., Henry S., Martinez-Chois C., D'Innocenzo M. & Falla J.** (2012b). An appraisal of *Miscanthus x giganteus* cultivation for fly ash revegetation and soil restoration. *Industrial Crops and Products*, **36**(1), 427-433.

**Técher D., Laval-Gilly P., Henry S., Bennasroune A., Formanek P., Martinez-Chois C., D'Innocenzo M., Muanda F., Dicko A., Klement R. & Falla J.** (2011). Contribution of *Miscanthus x giganteus* root exudates to the biostimulation of PAH degradation: an *in vitro* study, *Science of the Total Environment*, **409** (20), 4489-4495.

**Técher, D., Martinez-Chois, C., D'Innocenzo, M., Laval-Gilly, P., Bennasroune, A., Foucaud, L. & Falla, J.** (2010). Novel perspectives to purify genomic DNA from high humic acid content and contaminated soils. *Separation and Purification Technology*, **75**(1), 81-86.

**Formanek P., Rejsek K., Vranova V., Techer D., Laval-Gilly P., Falla J.** (2009). Amino acids in root exudates of *Miscanthus x giganteus*. Meeting abstract, *Amino Acids*, **37**, 49-49.

**Técher D., Laval-Gilly P., Henry S., Bennasroune A., Martinez-Chois C., D'Innocenzo M., Falla J.** Assessment of *Miscanthus x giganteus* for phytoremediation of long term PAH contaminated soils. *soumis*

**Técher D., Laval-Gilly P., Henry S., Bennasroune A., Martinez-Chois C., D'Innocenzo M., Falla J.** Assessment of *Miscanthus x giganteus* secondary root metabolites for the biostimulation of PAH-utilizing soil bacteria. *soumis*

### Presse académique

**C. P. Martínez-Chois, D. E. Técher, P. Laval-Gilly & J. Falla.** (2010). Croissance de *Miscanthus x giganteus* (MxG) sur sols de friche pollués en ETM et HAP : étude en mésocosmes, *Séminaire de l'Ecole Doctorale, Nancy France, janvier 2010*, 7p.

**L. Hromadko, V. Vranova, D. Techer, P. Laval-Gilly, K. Rejšek, P. Formanek & J. Falla.** (2010). Composition of root exudates of *Miscanthus x Giganteus* Greef et Deu. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*, **LVIII**(1), 71–76, ISSN: 1211-8516.

### Communications orales

**C P Martinez-Chois, P Laval-Gilly, S Henry, A Bennasroune, D E Techer, M D'innocenzo, A Bonnefoy, S. Bostelle and J Falla.** (5 - 7 Octobre 2011). Brownfield soil dynamics and *Miscanthus x giganteus* growth. *5<sup>th</sup> International Conference: Innovative solutions for revitalisation of degraded areas*. Ustroń (Poland).

**D Techer, P Laval-Gilly, P Formanek, S Henry, A Bennasroune, C Martinez-Chois, M D’Innocenzo, F Muanda, A Dicko, R Klement & J Falla.** (2011). Contribution of *Miscanthus x giganteus* root exudates to the biostimulation of PAH degradation: an *in vitro* study, *International symposium on Toxicity Assessment, 15<sup>th</sup>, 3 – 8 July 2011*, Hong Kong, China.

**D Techer, P Laval-Gilly, P Formanek, S Henry, A Bennasroune, C Martinez-Chois, M D’Innocenzo, F Muanda, A Dicko, R Klement & J Falla.** (22 juin 2011). Contribution des exsudats racinaires de *Miscanthus x giganteus* à la biostimulation de la dégradation des HAP : étude *in vitro*, *Colloque de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée*, MNHN Paris.

**Técher D.** (2011). Réhabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus x giganteus*. Journées recherche Service Friches Urbaines et Sites Pollués (13 - 14 janvier 2011), ADEME-Angers.

### **Communications affichées**

**Técher D., Laval-Gilly P., Henry S., Bennasroune A., Martinez-Chois C., D’Innocenzo M., Falla J.** (3 – 8 July 2011). An appraisal of *Miscanthus x giganteus* cultivation for fly ash revegetation and soil restoration, *International symposium on Toxicity Assessment, 15<sup>th</sup>*, Hong Kong, China.

**Técher Didier, Martinez-Chois Claudia, Laval-Gilly Philippe, Bennasroune Amar, Foucaud Laurent, Bonnefoy Antoine, Falla Jairo.** (Mars 2010). Développement d’une méthode rapide d’extraction-purification d’ADN génomique : application à des sols contaminés et riches en acides humiques- *Congrès SEFA*, Versailles, France.

**C. P. Martínez-Chois, D. E. Técher, A. Bonnefoy, P. Laval-Gilly & J. Falla.** (janvier 2010). Etude en mésocosmes de la croissance de *Miscanthus x giganteus* (MxG) sur sols de friche pollués (ETM, HAP, pollutions mixtes). *Séminaire RP2E*, Nancy France.

**Técher D., Martinez-Chois C., Laval-Gilly P. and Falla J.** (Août 2009). Novel perspectives for metagenomic nucleic acid extraction and purification from industrially polluted soils applied to molecular bacterial diversity analysis- *ISTA 14<sup>th</sup> (International Symposium on Toxicity Assessment)*, Metz France.

**P. Formanek, K. Rejsek, V. Vranova, D. Techer, P. Laval-Gilly and J. Falla.** (August 2009). Amino acids in root exudates of *Miscanthus x Giganteus* - 11<sup>th</sup> International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, Vienna (Austria).

**Técher D., Martinez-Chois C., Laval-Gilly P. et Falla J.** (15 janvier 2009). Bioremédiation de sols contaminés par des ETM et HAP grâce à la culture de *Miscanthus x giganteus* (essais préliminaires) - *Séminaire RP2E*, Nancy France.

# Sommaire

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>10</b>
<b>I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>14</b>
<b>I.1. Les sols dégradés par l'activité anthropique</b>	<b>14</b>
I.1.1. Les sols de friches industrielles pollués par les HAP	14
I.1.1.1. Définition et origine des HAP	14
I.1.1.2. Propriétés physico-chimiques	16
I.1.1.3. La contamination des sols par les HAP	18
I.1.1.4. Toxicité des HAP	19
I.1.1.5. Aspects réglementaires de la gestion des sites et sols pollués	26
I.1.2. Les parcs à cendres	27
I.1.2.1. Généralités	27
I.1.2.2. Origine et production des cendres	29
I.1.2.3. Classification des cendres	30
I.1.2.4. Caractéristiques et propriétés physico-chimiques	31
I.1.2.5. Processus pédogénétiques de « vieillissement » du substrat	35
I.1.2.6. Evaluation écotoxicologique	36
I.1.2.7. Evaluation simplifiée des risques du site EDF Richemont	36
I.1.2.8. Aspects réglementaires	37
<b>I.2. Réhabilitation des sols dégradés</b>	<b>37</b>
I.2.1. Généralités	37
I.2.2. Bioremédiation des sols pollués par les HAP	38
I.2.2.1. Biodégradation bactérienne	38
I.2.2.2. Régulations géniques	50
I.2.2.3. Biodégradation par les champignons	56
I.2.3. Phytoremédiation des sols pollués par les HAP	56
I.2.3.1. Définitions	56
I.2.3.2. Avantages de la phytoremédiation	58
I.2.3.3. Limites de la phytoremédiation	59
I.2.3.4. Rhizoremédiation des HAP	59
I.2.3.5. Biostimulation de la dégradation des HAP	70
I.2.4. Revégétalisation des sols dégradés à faible potentiel agronomique : cas des cendres volantes	86
<b>I.3. Choix de <i>Miscanthus x giganteus</i> dans la phytoremédiation</b>	<b>88</b>
I.3.1. Présentation du matériel biologique	88
I.3.2. Valorisation de la biomasse	91
I.3.3. Résistances aux stress abiotiques et biotiques	92
I.3.4. Méthodes de culture	93
I.3.5. Caractéristiques agronomiques et aspects environnementaux	93
I.3.6. Revégétalisation et phytoremédiation des sols	95
<b>I.4. Conclusion et objectifs de recherche</b>	<b>97</b>

<b>II.</b>	<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>101</b>
<b>II.1.</b>	<b>La plante : <i>Miscanthus x giganteus</i></b>	<b>102</b>
II.1.1.	Sécrétions racinaires	102
II.1.1.1.	Etude préliminaire des produits rhizosphériques	103
II.1.1.2.	Etude des exsudats racinaires : identification des métabolites secondaires	104
II.1.2.	Cultures en microcosmes	105
II.1.2.1.	Préparation des rhizomes	105
II.1.2.2.	Conditions de culture	106
II.1.2.3.	Paramètres physiologiques mesurés	106
II.1.3.	Cultures en champs	107
II.1.3.1.	Plantation en sols de friche contaminés	107
II.1.3.2.	Plantation dans le parc à cendres	109
<b>II.2.</b>	<b>Les sols de friche et sols de « référence »</b>	<b>110</b>
II.2.1.	Historique	112
II.2.1.1.	Sols de friche contaminés en HAP et en métaux	112
II.2.1.2.	Parc à cendres	112
II.2.2.	Echantillonnage, collecte et préparation des sols	113
II.2.2.1.	Sols de friche	113
II.2.2.2.	Sols de « référence »	113
II.2.3.	Caractérisation physico-chimique	115
II.2.3.1.	Etat initial : fraction totale des sols	115
II.2.3.2.	Analyse des fractions hydrosolubles de sol	117
II.2.3.3.	Evaluation écotoxicologique	119
<b>II.3.</b>	<b>Etudes microbiologiques</b>	<b>121</b>
II.3.1.	Impact du co-métabolisme sur la sélection de souches dégradantes	121
II.3.1.1.	Spécifications générales	121
II.3.1.2.	Préparation des cultures mixtes bactériens	122
II.3.1.3.	Identification génétique des souches isolées (ADNr 16S)	123
II.3.2.	Influence des exsudats racinaires sur la biostimulation des cultures mixtes dégradants : tests en microplaques	123
II.3.2.1.	Effet de produits rhizosphériques sur la biostimulation à court terme (21h) d'un consortium dégradant	125
II.3.2.2.	Effets des exsudats sur la biostimulation de cultures mixtes dégradants : effets chroniques	126
II.3.2.3.	Identification des métabolites secondaires potentiellement impliqués dans la biostimulation bactérienne	127
II.3.2.4.	Essais en microcosmes	129
<b>II.4.</b>	<b>Traitement statistique des données</b>	<b>139</b>
<b>III.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>141</b>
<b>III.1.</b>	<b>Impact des exsudats racinaires sur la biodégradation des HAP par co-métabolisme : études <i>in vitro</i></b>	<b>141</b>
III.1.1.	Détermination des profils de contamination en HAP des sols de friche et choix des molécules à tester	141
III.1.2.	Collecte et identification des exsudats racinaires de <i>Miscanthus x giganteus</i>	143

III.1.3.	Biostimulation de la croissance bactérienne et de l'activité de dégradation des HAP : tests en microplaques	148
III.1.3.1.	Isolement et identification de cultures mixtes bactériens dégradants	148
III.1.3.2.	Essais en microplaques : étude préliminaire des effets à court terme	155
III.1.3.3.	Biostimulation par les exsudats racinaires : évaluation des effets chroniques	158
<b>III.2.</b>	<b>ESSAIS EN MICROCOSMES</b>	<b>194</b>
III.2.1.	Détermination des caractéristiques physico-chimiques des sols	194
III.2.2.	Teneurs en métaux et composés cyanurés dans les sols	197
III.2.3.	Caractérisation écotoxicologique des sols de friches H2 et M2	199
III.2.4.	Développement d'une nouvelle méthode d'extraction-purification d'ADN de sol	201
III.2.5.	Essais en microcosmes « reconstitués » avec sol standard A3	207
III.2.5.1.	Dénombrement de la microflore totale	208
III.2.5.2.	Dénombrement de la microflore dégradante	209
III.2.5.3.	Dissipation des HAP dans les modalités de sol A3 contaminé	210
III.2.5.4.	Analyse des profils de diversité des communautés bactériennes	212
III.2.6.	Essais en sols de friche	213
III.2.6.1.	Essais en sol contaminé H1	213
III.2.6.2.	Essais en sols de friche contaminés H2 et M2	218
III.2.7.	Développement de MxG dans les sols	225
III.2.7.1.	Croissance des tiges	225
III.2.7.2.	Biomasse et hydratation	226
III.2.7.3.	Teneurs en chlorophylle	228
III.2.8.	Impact de la culture de MxG sur la qualité des sols	228
III.2.8.1.	Paramètres physico-chimiques et biologiques	228
III.2.8.2.	Tests de toxicité des lixiviats	237
<b>III.3.</b>	<b>ESSAIS EN CHAMPS</b>	<b>238</b>
III.3.1.	Sols de friche pollués	238
III.3.2.	Parc à cendres	240
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>245</b>
<b>V.</b>	<b>REFERENCES</b>	<b>252</b>
<b>VI.</b>	<b>ANNEXES</b>	<b>290</b>

# **INTRODUCTION GENERALE**

La région Lorraine possède un passé industriel centré sur l'industrie sidérurgique et minière. Elle détient un nombre important de sites dégradés, à faible potentiel agronomique et inaptes aux cultures vivrières. En effet, la cessation des activités liées à l'exploitation des mines de charbon ainsi que les crises successives dans le milieu de la sidérurgie ont entraîné l'apparition de milliers d'hectares de friches industrielles caractérisés par des contaminations variées. Plus de 6000 hectares de friches ont été répertoriés, distribués sur 360 sites (~ 8% de l'effectif national), plaçant la région Lorraine au 4<sup>ème</sup> rang national dans l'inventaire des sites de friches industrielles fortement contaminés (DREALL, 2010). Ces anciennes exploitations, laissées le plus souvent en l'état après le démantèlement des installations, sont généralement caractérisées par une pollution à la fois organique (hydrocarbures) et minérale (métaux, sels). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAP, sont parmi les polluants organiques les plus représentés. Les taux de contamination détectés peuvent présenter des risques immédiats ou différés pour les riverains ou l'environnement, et nécessiter des mesures de restriction d'usage (BRGM, 2000). D'autres sites d'exploitation posent également la question du risque environnemental de par leur fonction de « stockage » des co-produits ou des déchets de l'industrie. Les « parcs à cendres », qui sont des terrils de cendres dites « volantes » en raison de leur caractère pulvérulent, font partie de cette catégorie. L'ancienne centrale thermique d'Electricité De France (EDF) implantée à Richemont (57270) a longtemps fonctionné au charbon, produisant plus de 250000 tonnes de cendres actuellement entreposées sur le site. Ces bassins de stockage nécessitent l'application de mesures de protection contre les phénomènes érosifs, essentiellement éoliens. L'installation d'un couvert végétal permettrait d'éviter l'excavation du matériau tout en favorisant le développement de processus naturels de restauration de sol.

La gestion des ressources biologiques des sols doit être considérée comme un élément essentiel à la pérennité de cet écosystème (Nielsen & Winding, 2002; Schindelbeck et al., 2008; Visser & Parkinson, 1992). La qualité biologique des sols fait référence à l'abondance, la diversité et l'activité des organismes participant au fonctionnement de ces écosystèmes. Les microorganismes sont fréquemment utilisés comme indicateurs biologiques de la qualité des sols car ils ont la particularité d'intégrer l'ensemble des modifications physico-chimiques du

milieu et de répondre rapidement à ces changements (Nielsen & Winding, 2002). Ils sont, de plus, impliqués dans la plupart des processus essentiels au bon fonctionnement des écosystèmes incluant : la décomposition des résidus animaux et végétaux, la synthèse des composés humiques, la formation et la stabilisation de la structure du sol, la transformation et le stockage des nutriments, les échanges gazeux et hydriques, l'immobilisation et la dégradation des molécules xénobiotiques (Schaetzl & Anderson, 2006; Visser & Parkinson, 1992).

Dans le cadre de la loi européenne d'orientation sur l'énergie votée à Bruxelles en 2003, la part des énergies renouvelables en France à l'horizon 2020 devra atteindre 21 % de la consommation électrique nationale (Directive 2003/30/CE). Afin de mettre en oeuvre les 4 à 5 millions d'hectares de cultures nécessaires à la réalisation de ce cahier des charges, l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) s'est intéressée aux possibilités d'utilisation des terrains dégradés pour produire de la biomasse (Amiot, 2004; Gruber & Py, 2004). En effet, ces sols non exploités constituent un potentiel hautement valorisable en termes de production de biomasse à vocation non alimentaire de par les surfaces concernées. Une telle initiative repose sur la sélection de cultures adaptées, *i.e.* capacité des plantes à croître sur une grande variété de supports dont des matrices multi-contaminées tout en minimisant la remobilisation des contaminants.

Si les sols pollués possèdent une microflore indigène particulièrement adaptée à la dégradation des HAP (Andreoni et al., 2004; Cunningham et al., 1996), l'apport, par les plantes, de composés organiques facilement assimilables à proximité des racines, *i.e.* exsudats racinaires (sucres, acides organiques), peut entraîner le développement spécifique de ces communautés bactériennes (Singer et al., 2003) et une plus grande dissipation des polluants rémanents (Aprill & Sims, 1990; Cunningham et al., 1996; Gerhardt et al., 2009; Ma et al., 2010a). La phytoremédiation, et en particulier la rhizoremédiation, en s'appuyant sur ces principes, constitue une technique de remédiation attractive quant à la réhabilitation des sols pollués. L'important développement racinaire de certaines espèces végétales permet également un apport significatif en matières carbonées (Beuch et al., 2000) et une stabilisation des agrégats du sol à plus long terme, participant *in fine* à l'amélioration de la qualité globale des sols (Cunningham et al., 1996; Fernando et al., 2004; Gerhardt et al., 2009).

Par ailleurs, la culture de *Miscanthus x giganteus* (MxG), graminée en C<sub>4</sub>, est en forte expansion depuis quelques années du fait de sa forte production de biomasse revalorisée sous forme énergétique. Cultivée avec succès sur un site expérimental dégradé (ancienne station de

lavage de charbon, Forbach, Moselle Est; Chois, 2006) par le Groupe d'Immunologie Microbiologie (IUT Thionville – Yutz, LIEBE-CNRS UMR 7146), MxG a témoigné de ses capacités à se développer sur un sol dégradé à faibles capacités agronomiques.

L'objectif de ce travail consiste en l'évaluation des possibilités de restauration de sols dégradés grâce aux processus de phytoremédiation liés à la culture de MxG. Deux catégories de sols dégradés ont été définies : une friche industrielle d'une ancienne cokerie contaminée en HAP et en métaux, et un parc à cendres de centrale thermique à charbon appartenant à Electricité De France (EDF). L'association de la culture de MxG à, d'une part, la bioremédiation des polluants organiques (sols pollués) et d'autre part, la stabilisation des matériaux pulvérulents, s'inscrit dans une politique de réhabilitation des sols dégradés (jusqu'à lors délaissés), tout en assurant la production d'une biomasse valorisable, en terme, notamment, de ressource énergétique (combustion). La démarche de travail qui a été adoptée dans la présente étude repose sur une phase d'expérimentations en laboratoire et une phase d'essais en champs, cette dernière visant à évaluer de manière exploratoire les possibilités de culture de MxG *in situ*.

Dans un premier temps, la revue de la bibliographie présentera les connaissances déjà acquises concernant les sols dégradés. L'accent sera porté sur la pollution des sols de friche industrielle par les HAP, les risques écotoxiques qui en découlent ainsi que les processus associés à la dissipation de ces contaminants, en particulier dans le compartiment rhizosphérique des sols. La revégétalisation des cendres volantes, substrat inerte aux caractéristiques physico-chimiques très différentes des sols naturels, sera également développée.

Dans un second temps seront présentés la démarche générale ainsi que les matériels et méthodes qui ont été choisis pour atteindre les objectifs fixés. Les moyens mis en œuvre dans l'analyse globale des processus de réhabilitation de sol seront regroupés selon les trois principales composantes des systèmes étudiés : la plante (MxG), les sols et les bactéries.

La partie suivante sera consacrée aux résultats et à leur interprétation. Une approche « bottom-up » a été définie, reposant sur la complexification des systèmes étudiés. Les interactions exsudats racinaires-bactéries-HAP seront appréhendées *in vitro* puis intégrées au niveau des sols, plus particulièrement sous l'influence de la rhizosphère de MxG. L'impact de la plante, à la fois dans la dissipation des polluants, la sélection des communautés bactériennes et les modifications de la qualité des différents substrats, seront ainsi analysés.

Les plantations en champ permettront de discuter la mise en place des cultures de manière pérenne *in situ*.

Enfin, la synthèse des principaux résultats de ce travail permettra d'ouvrir sur les perspectives à court et moyen terme.

# **I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I.1. Les sols dégradés par l'activité anthropique**

### **I.1.1. Les sols de friches industrielles pollués par les HAP**

#### ***I.1.1.1. Définition et origine des HAP***

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des composés organiques hydrophobes issus de la combustion incomplète des matières carbonées (Blumer, 1976; Cerniglia, 1992; Meinschein, 1961). Ces molécules sont constituées, au sens strict, d'atomes de carbone et d'hydrogène. Leur arrangement en structure cyclique comporte au moins deux cycles aromatiques condensés de type benzène (Blumer, 1976; Cerniglia, 1992; Meinschein, 1961).

Les HAP sont des polluants ubiquistes détectés dans tous les écosystèmes, des régions polaires aux tropiques (Blumer & Youngblood, 1975; Keith & Telliard, 1979; Wilcke, 2007). Du fait de leur caractère rémanent, potentiellement toxique, mutagène et cancérigène, seize d'entre eux ont été jugés comme prioritaires à éliminer des sols par l'USEPA dès les années 70 (« United States Environmental Protection Agency » ou Agence Américaine de Protection de l'Environnement; Tableau 1 p. 22) (Keith & Telliard, 1979). Par ailleurs, une liste de 15 + 1 HAP jugés également « préoccupants » par l'Union Européenne, dont 8 diffèrent de ceux listés par l'USEPA, a été établie (annexe 1) (Danyi et al., 2009; Gomez et al., 2009). Cependant, à ce jour, très peu d'études ont porté sur la bioremediation des HAP autres que ceux listés par l'USEPA, ces derniers demeurant les plus abondants dans l'environnement (Ma et al., 2010b).

Les HAP sont continuellement émis dans l'environnement par des phénomènes de pyrolyse-pyrosynthèse de la matière organique, des imbrûlés (contenus dans les combustibles fossiles), de diagenèse et de biogenèse (Blumer, 1961; Blumer & Youngblood, 1975; Richter & Howard, 2000; Thiele & Brümmer, 2002). Ces émissions peuvent être d'origines naturelles (mineures), ou anthropiques (majoritaires) (Blumer, 1961; Blumer & Youngblood, 1975;

Edwards, 1983; Edwards, 1983; Thiele & Brümmer, 2002; Wilcke, 2007). Les sources naturelles se répartissent entre les combustions (essentiellement les feux de forêts sources de pyrène et de fluoranthène, et les éruptions volcaniques) et la formation géologique des combustibles fossiles tels que le pétrole et le charbon (processus de diagenèse) (Blumer, 1976; Burgess et al., 2003; Wilcke, 2007). Dans la plupart des cas, la fraction des HAP à 3 cycles constitue au moins 90% des hydrocarbures aromatiques formés (Blumer, 1976; Wilcke, 2007). Plusieurs travaux ont aussi mis en évidence l'origine biogène de certains HAP tels que le naphthalène (Azuma et al., 1996; Chen et al., 1998; Daisy et al., 2002; Jurgens et al., 2000; Wilcke et al., 2000; Wolfgang, 2000; Wolfgang et al., 2003), le phénanthrène (Sims & Overcash, 1983; Wilcke et al., 2000; Wilcke et al., 2004), et le pérylène, produit de la dégradation naturelle de la chlorophylle (Guggenberger et al., 1996; Venkatesan, 1988; Wilcke et al., 2000; Wilcke et al., 2002). Il s'agit dans tous les cas de sources de contaminations mineures et diffuses (Wilcke, 2007).

Les activités anthropiques constituent la part la plus importante des émissions de HAP : processus de production et de dispersion de matières créosotées (chemins de fer), industries des hydrocarbures et associé(e)s (brai de goudron, asphalte et épandage de boues), déversements accidentels, trafic routier, effluents domestiques, dépôts atmosphériques (Björseth et al., 1979; Cerniglia, 1992; Denier van der Gon et al., 2007; Edwards, 1983; Johnsen & Karlson, 2007; Kim et al., 2003; Shuttleworth & Cerniglia, 1995; Whitacre et al., 2008). A long terme, ces dernières constituent une source importante d'intrants dans les sols. Les sources d'émission des HAP sont donc, suivant les cas, diffuses ou ponctuelles, les sources ponctuelles incluant les degrés de contamination les plus critiques (BRGM, 2000). Le devenir de ces HAP est fonction des processus de volatilisation, de photo-oxydation, d'oxydation chimique, d'adsorption aux particules de sol, de lixiviation et de biodégradation (Björseth et al., 1979; Cerniglia, 1992; Johnsen & Karlson, 2007; Mackay & Wania, 1995; Shuttleworth & Cerniglia, 1995).

### ***1.1.1.2. Propriétés physico-chimiques***

La connaissance des propriétés physico-chimiques des HAP permet de mieux prévoir leur répartition et leur impact potentiel sur les différents compartiments de l'environnement (air, eau, sol, sédiments et êtres vivants) (Blumer, 1976; Blumer & Youngblood, 1975).

Les HAP sont classés en deux catégories : les « légers » à faible poids moléculaire, *i.e.* 2 à 3 cycles aromatiques, et les « lourds », à 4 cycles et plus (Cerniglia, 1992). Ce sont des molécules non polaires dont les cycles sont arrangés de manière linéaire, angulaire ou en « cluster » (Blumer, 1976; Bossert & Bartha, 1986). La stabilité électrochimique des HAP s'explique par la densité des électrons « pi » de part et d'autre des noyaux aromatiques, les rendant résistants aux attaques nucléophiles (Blumer, 1976; Blumer & Youngblood, 1975; Johnsen et al., 2005). Les molécules angulaires sont ainsi plus stables que les linéaires (Blumer, 1976; Bossert & Bartha, 1986; Johnsen et al., 2005). Les temps de demi-vie dans les sols et sédiments varient, par exemple, de 16 à 126 jours pour le phénanthrène (3 cycles) à 229 à 1400 jours pour le benzo(a)pyrène (5 cycles) (Shuttleworth & Cerniglia, 1995).

Leur solubilité en milieu aqueux, bien que notable pour le naphthalène ( $31 \text{ mg.l}^{-1}$ , 2 cycles), décroît avec le nombre de cycles aromatiques ( $132 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$  pour le pyrène à 4 cycles,  $3 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$  pour le benzo(a)pyrène à 5 cycles) (Bossert & Bartha, 1986). Il en est de même pour la volatilité avec des tensions de vapeur saturante allant de 6,5 Pa pour le naphthalène à 0,08 Pa pour le pyrène et  $7,3 \cdot 10^{-7}$  Pa pour le benzo(a)pyrène (Bossert & Bartha, 1986). Les coefficients de partage octanol-eau (Log Kow), traduisant notamment l'affinité pour les membranes biologiques, varient de 3,54 (naphthalène) à 7,07 (dibenzo(a,h)anthracène) (Paasivirta et al., 1999). Ces valeurs élevées indiquent un fort potentiel de bioaccumulation et de biomagnification des HAP (augmentation de leur concentration à chaque maillon de la chaîne trophique) (Shuttleworth & Cerniglia, 1995), ainsi qu'un fort potentiel d'adsorption sur les matières particulaires<sup>1</sup> (Shuttleworth & Cerniglia, 1995). Les HAP sont par conséquent fréquemment adsorbés aux poussières et particules de sol, ce qui favorise leur dispersion atmosphérique (Björseth et al., 1979; Johnsen & Karlson, 2007; Mackay & Wania, 1995). Enfin, l'hydrophobicité, la rémanence et la toxicité des HAP augmentent généralement avec le nombre de noyaux aromatiques (Bossert & Bartha, 1986; Cerniglia, 1992).

---

<sup>1</sup> un coefficient d'adsorption Kd ou coefficient de distribution sol-eau caractérise la mobilité de la substance active. Il peut être mesuré expérimentalement en mettant en présence une solution de la substance et une masse donnée du sol et calculé selon une isotherme linéaire. Il est exprimé en  $\text{cm}^3/\text{g}$ . Par extension, le Koc est obtenu en rapportant Kd à la fraction de carbone organique du sol ( $\text{Koc} = \text{Kd} / \text{foc}$ ).

**Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des 16 HAP établis comme polluants prioritaires par l'USEPA (Doyle et al., 2008; Keith & Telliard, 1979); \*: molécules classées cancérigènes potentiels pour l'homme d'après l'USEPA (Bojes & Pope, 2007).**

	Formule brute	Poids moléculaire (g/mole)	Point d'ébullition (°C)	Point de fusion (°C)	Solubilité (mg/L)	Aspect
 Naphthalène	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	128	218	77	31	Cristaux incolores
 Acénaphthène	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	154	279	95	3,8	Poudre cristalline jaune pâle ou blanche
 Acénaphthylène	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	152	280	94	16,1	Poudre cristalline jaune
 Anthracène	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178	340	218	0,045	Cristaux verts pâles à grisâtres
 Phénanthrène	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178	340	99,5	1,1	Cristaux incolores
 Fluorène	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	166	295	116	1,9	Cristaux incolores
 Pyrène	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202	404	145	0,132	Solide incolore à jaune clair
 Fluoranthène	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	203	375	111	0,26	Aiguilles jaunes claires
 Benzo[a]anthracène	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228	438	158	0,011	Flocons incolores à marrons clairs
 Chrysène *	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228	448	253	0,001	Poudre cristalline
 Benzo(a)pyrène *	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252	495	179	0,003	Cristaux jaunes
 Benzo(b)fluoranthène *	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252	481	168	0,0015	Cristaux incolores
 Benzo(k)fluoranthène *	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252	480	216	0,0008	Cristaux jaunes
 Dibenzo(a,h)anthracène*	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	278	524	266	0,0005	Solide cristallin incolore à jaune
 Benzo(g,h,i)peryène	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276	550	277	0,00026	Gros cristaux verts à jaunes pâles
 Indéno(1,2,3-cd)pyrène *	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276	536	162	0,062	Solide cristallin

### ***1.1.1.3. La contamination des sols par les HAP***

#### ***1.1.1.3.1. Généralités***

Bien que les HAP soient principalement véhiculés par l'air, les sols constituent le réservoir ultime de ces contaminants (Bjørseth et al., 1979; Haritash & Kaushik, 2009). L'étude, à l'échelle des continents, de la contamination des sols par ces substances indique qu'il y a, deux types distincts de contamination : un bruit de fond « naturel » et une pollution d'origine anthropique (Edwards, 1983; Wilcke, 2007) (voir le chapitre 1.1.1.1). Le premier, caractérisé par une contamination diffuse, est dominé par la présence de 3 HAP légers : le naphthalène, le phénanthrène et le perylène. Ce profil est également caractéristique des régions tropicales (Wilcke, 2007; Wolfgang, 2000). Le second, résultant des dépôts atmosphériques issus des activités humaines, met en évidence 8 HAP lourds parmi les 16 établis dans la liste de l'USEPA : le benzo(a)anthracène, le chrysène, le benzo(b)fluoranthène, le benzo(k)fluoranthène, le benzo(a)pyrène, l'indéno(1,2,3-cd)pyrène, le dibenzo(a, h)anthracène, et le benzo(g, h, i)pérylène (Wilcke, 2007). A ces 8 HAP s'ajoutent, dans les zones tempérées, une contamination des sols par le fluoranthène, le pyrène et le benzo(j, k)fluoranthène (Wilcke, 2007).

#### ***1.1.1.3.2. Cas des sols de friches industrielles***

L'essor industriel qu'a connu l'Europe depuis le milieu du XIX<sup>ième</sup> siècle a engendré une augmentation significative des concentrations en HAP lourds dans les sols continentaux (Denier van der Gon et al., 2007; Edwards, 1983; Johnsen et al., 2005). Le degré de pollution peut alors s'élever à plusieurs grammes de HAP totaux par kg de sol dans certaines friches (Bispo et al., 1999; Cebron et al., 2009; Haeseler et al., 1999; Hamdi et al., 2007; Saison et al., 2004; Vinas et al., 2005). A titre d'exemple, des concentrations de phénanthrène et de pyrène de l'ordre de 100 à 200 mg/kg de sol sont souvent reportées dans les sols industriels (Cornelissen et al., 1998). Les valeurs maximales reportées à notre connaissance font état de 10 à 30 g de HAP par kg de sol au niveau de « hot spots » de contamination dans une ancienne usine à gaz (Bedford aux Etats-Unis) (Khodadoust et al., 2000). En comparaison, les concentrations en HAP d'origine naturelle varient de 1 à 10 µg de HAP individuel par kg de sol (Wolfgang, 2000). Les sites industriels les plus contaminés incluent les usines à gaz, les raffineries de pétrole, les usines de créosotage et les anciennes cokeries (Wilson & Jones, 1993) dont les traitements thermiques permettant d'obtenir le coke entraînent la formation de

goudrons renfermant une part importante de HAP (17%) ainsi que d'autres contaminants chimiques (benzols, phénols, acides cyanhydriques...) (Haeseler et al., 1999).

La contamination des sols industriels est caractérisée par une grande hétérogénéité spatiale souvent décrite par des modèles stochastiques (Weigand et al., 2001). Elle atteint parfois des profondeurs de l'ordre du mètre (Bu et al., 2009; Weigand et al., 2001). Les types de HAP présents majoritairement varient avec l'historique de l'exploitation industrielle du site (Alexander, 2000). Si les concentrations observées peuvent être importantes à proximité des sites industriels, elles diminuent de manière exponentielle en fonction de la distance à la source émettrice (Crepineau et al., 2003).

Les sols de friches sont aussi caractérisés par un « vieillissement » de la contamination qui se traduit, pour les HAP, par une volatilisation et/ou dégradation des molécules les plus légères (2 à 3 cycles) et par une séquestration des molécules les plus « lourdes » dans la matrice organo-minérale du sol (Alexander, 2000; Bogan & Sullivan, 2003; Nam et al., 1998). Ce phénomène est dû à une diffusion progressive des micropolluants dans les nanopores du sol, limitant par la suite les transferts de masses dans la phase aqueuse et la biodisponibilité des HAP (Bogan & Sullivan, 2003; Huesemann, 1997).

De nombreuses études ont indiqué que la diminution de la biodisponibilité des HAP suite à leur séquestration naturelle dans le sol s'accompagne d'une diminution de la toxicité, interrogeant par là-même sur la nécessité de remédiation dans les cas de contaminations persistante après traitement ou « vieillissement » des sols (Alexander, 2000). Cependant, d'autres travaux ont, au contraire, montré que le caractère récalcitrant des HAP lourds à la biodégradation s'expliquerait davantage par des facteurs microbiens (*i.e.* absence de populations dégradantes ou d'activité de biodégradation) que par une diminution de leur biodisponibilité : une désorption rapide et importante des molécules est alors observée malgré le transfert des HAP dans la matrice minérale (Cornelissen et al., 1998; Huesemann et al., 2004). Ces résultats font partie intégrante des études d'évaluation des risques et de mise en œuvre de procédés de réhabilitation des sols.

#### ***1.1.1.4. Toxicité des HAP***

##### ***1.1.1.4.1. Généralités***

La toxicité des HAP varie en fonction de la molécule considérée, du type d'exposition (aigue ou chronique), de l'organisme et des cellules cibles ainsi que des conditions environnementales (Fent, 2003). Trois mécanismes généraux ont été décrits : la narcose non

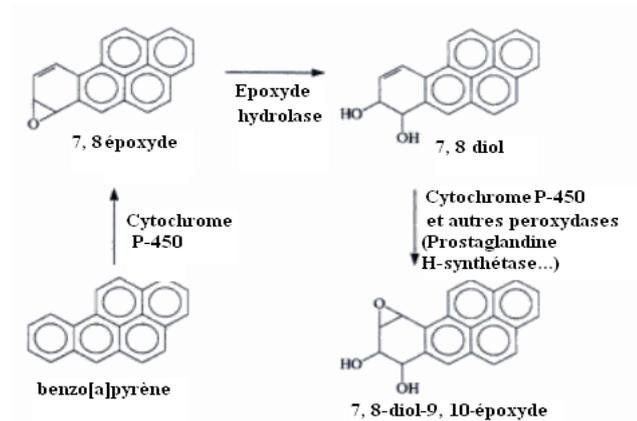
polaire (ou toxicité de base) (Saiz et al., 2009; Sverdrup et al., 2002), l'activation biochimique (Fent, 2004; Lundstedt et al., 2007) et la toxicité photo-induite (photoactivation par les UV) (Botta et al., 2009; Teranishi et al.). La narcose non polaire résulte de l'absorption cutanée et/ou de l'ingestion de HAP provenant de l'eau interstitielle des sols et leur partage dans les lipides corporels ; elle constitue l'un des principaux modes de toxicité des HAP pour les invertébrés dans le sol directement exposés aux contaminants (Sverdrup et al., 2002). Les deux autres mécanismes (activation biochimique et toxicité photo-induite), sont impliqués dans la majorité des effets toxiques (généotoxicité, mutagénicité, cancérogénicité, tératogénicité, immunotoxicité perturbation du système endocrinien) (Kanaly & Harayama, 2010; Reynaud & Deschaux, 2006; Van de Wiele et al., 2004). En effet, les HAP, molécules relativement simples et chimiquement stables, doivent souvent subir une activation biologique (métabolisation par des enzymes de détoxification cellulaire) ou physico-chimique (photo-oxydation) pour être transformés en métabolites réactifs. Ils acquièrent alors des propriétés électrophiles et peuvent exercer une toxicité directe sur les biomolécules (Miller & Ramos, 2001).

#### ***1.1.1.4.2. Mécanismes de toxicité cellulaire***

Afin d'élucider les réactions biochimiques mises en jeu lors de la bioactivation des HAP, la majorité des travaux ont été conduits sur des animaux ou des cellules modèles (Xue & Warshawsky, 2005). Il existe trois voies principales de métabolisation des HAP (Xue & Warshawsky, 2005).

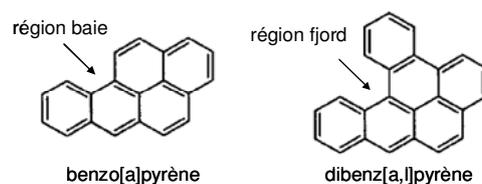
##### **Première voie de métabolisation des HAP**

La théorie de formation d'époxydes dihydrodiols hautement toxiques due à la présence de régions « baies » (Figure 2) est la plus répandue (Xue & Warshawsky, 2005). Les systèmes enzymatiques responsables de cette biotransformation sont des complexes mono-oxygénases à cytochrome P-450. Ces enzymes participent à la détoxification des xénobiotiques en les convertissant en dérivés plus hydrosolubles théoriquement éliminés par l'organisme (Fent, 2004; Leupold et al., 1992). D'autres peroxydases (prostaglandines synthases, lipoxygénases) et époxydes hydrolases sont aussi impliquées dans la bioactivation des HAP (Miller & Ramos, 2001) (Figure 1).



**Figure 1 : Bioactivation séquentielle du benzo[a]pyrène.** De multiples enzymes catalysent la biotransformation du benzo[a]pyrène en 7, 8-diol-9, 10, époxyde, molécule cancérigène (d'après (Sullivan & Krieger, 2001)).

Les diol-époxydes tels que le 7,8-diol-9, 10-époxyde (Figure 1) sont des métabolites très réactifs aux propriétés mutagènes et cancérigènes (Cerniglia, 1984; Cerniglia, 1992; Baird et al., 2005). La cancérogénicité est fréquemment observée pour des HAP de 4 à 6 cycles dont sept sont classés cancérigènes pour l'homme par l'USEPA : le chrysène, benzo(a)pyrène, le benzo(b)fluoranthène, le benzo(k)fluoranthène, le dibenzo(a,h)anthracène et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène (Bojes & Pope, 2007). La dissymétrie de ces molécules associée à des configurations structurales particulières, appelées région « baie » et région « fjord », favorisent les réactions d'époxydation (Dabestani & Ivanov, 1999; Pahlman & Pelkonen, 1987). Ces régions moléculaires correspondent à des structures angulaires ou « creux » formées par des anneaux benzéniques angulaires saturés et fusionnés avec d'autres noyaux aromatiques (Figure 2).



**Figure 2 : Régions moléculaires impliquées dans la formation de diol-époxydes ayant un potentiel cancérigène,** d'après (Baird et al., 2005).

Cette configuration gouverne les modalités d'oxydation et de formation de radicaux cationiques au sein de la molécule du fait de la gêne stérique résultante (Xue & Warshawsky, 2005).

### **Seconde voie de métabolisation des HAP**

La seconde voie de biotransformation consiste en la formation d'un radical cation suite à l'oxydation par un électron de la molécule de HAP, la réaction étant catalysée par les cytochromes P-450 peroxydases (Cavalieri & Rogan, 1995). Les HAP ainsi métabolisés, comme le benzo(a)pyrène ou le dibenz[a,l]pyrène, ont en commun un potentiel d'ionisation bas ne dépassant pas 7,35 eV, ce qui favorise l'arrachement d'un électron (Cavalieri et al., 1992).

### **Troisième voie de métabolisation des HAP**

Enfin, la troisième voie de bioactivation suggère la formation de *o*-quinones très réactifs *via* des réactions catalysées par des dihydrodiols déshydrogénases à partir de catéchols (Penning et al., 1998; Xue & Warshawsky, 2005). Beaucoup de quinones sont potentiellement inductrices de la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) : la naphthoquinone et le phénanthroquinone sont parmi les molécules les plus susceptibles d'induire la production de ROS conduisant à un stress oxydant (dégradations par oxydations touchant les biomolécules, *i.e.* lipides, protéines, acides nucléiques) (Hasspieler et al., 1994). En présence d'oxygène moléculaire, les semi-quinones peuvent s'auto-oxyder et transférer des électrons aux atomes d'oxygènes, conduisant à la formation d'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) qui pourrait à son tour réagir avec le peroxyde d'hydrogène cellulaire ( $H_2O_2$ ) et donner  $OH\cdot$  (Hasspieler et al., 1994).

D'autres voies enzymatiques moins fréquentes liées par exemple à la formation d'ester de l'acide sulfurique (à partir de HAP méthylés) peuvent aussi être impliquées dans le métabolisme de molécules très réactives (Surh & Miller, 1994). De plus, beaucoup d'interactions entre les HAP et d'autres molécules sont susceptibles d'augmenter le potentiel de génotoxicité et de cancérrogénicité du mélange (White, 2002). La mutagénicité et cancérrogénicité du 1-nitropyrène par exemple, forme nitratée du pyrène, a été clairement établie *via* le test d'*Ames*<sup>2</sup> (Gorse et al., 1983), alors que le pyrène est non cancérrogène et faiblement mutagène d'après le même test (Cerniglia, 1984).

---

<sup>2</sup> évaluation de la mutagénicité par induction de la réversion de souches bactériennes *Salmonella typhimurium* initialement incapables de synthétiser de l'histidine

#### ***1.1.1.4.3. Ecotoxicité des HAP dans les sols***

Dans les sols, la toxicité des HAP est directement fonction de la quantité de polluants et de leur biodisponibilité. En effet, du fait de leur très faible solubilité aqueuse, les HAP ont tendance à s'adsorber à la matière organique du sol et à migrer progressivement dans les microagrégats, diminuant leur accessibilité aux microorganismes et aux plantes (Alexander, 2000). Les effets écotoxiques de la pollution par les HAP se traduisent par des altérations biologiques tant aux niveaux moléculaires que populationnels, sur des organismes aussi divers que les bactéries (Maliszewska-Kordybach et al., 2007; Sverdrup et al., 2002), les champignons (Chiapusio et al., 2007), les protozoaires (Sverdrup et al., 2002), les vers de terre (Eom et al., 2007; Jonker et al., 2007), les arthropodes (Bouchard, 1999; Eom et al., 2007; Hamdi et al., 2007) et les plantes (Baud-Grasset et al., 1993) (Eom et al., 2007; Sverdrup et al., 2003).

Dans le cadre de cette étude sur la phytoremédiation des sols pollués, nous nous sommes particulièrement intéressés à la toxicité des HAP vis-à-vis des bactéries et des plantes. Certaines communautés bactériennes impliquées dans des fonctions biogéochimiques particulières (bactéries nitrifiantes) peuvent en effet se révéler plus sensibles que d'autres groupes saprotrophes (Maliszewska-Kordybach et al., 2007; Sverdrup et al., 2002). Il en est de même pour les végétaux dont les réponses physiologiques peuvent aussi varier en fonction de la texture des sols, de l'âge de la plante et de l'espèce considérée (Chiapusio et al., 2007).

#### **Compartiment bactérien**

La biodégradation des HAP dans les sols ne conduit pas systématiquement à la minéralisation ou disparition complète des composés. Il peut y avoir formation et libération dans le milieu de métabolites de dégradation qui peuvent être des intermédiaires réactifs de types phénols, quinones et dihydrodiols (Liu et al., 1992). Ces composés, plus solubles que les molécules « mères », sont susceptibles de diffuser dans le milieu et d'exercer leur toxicité (Xue & Warshawsky, 2005). Cependant, très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant l'impact biologique de ces métabolites (Pagnout et al., 2006; Sepic et al., 2003). La toxicité de neuf métabolites de dégradation du fluoranthène, pris individuellement, par *Pasteurella* sp. IFA montre par exemple qu'à l'exception du 9-hydroxyfluorène qui est quatre fois plus toxique que le fluoranthène, tous les autres métabolites sont 37 à 3000 fois moins toxiques que la molécule mère (Sepic et al., 2003). Ces expériences ne traitent toutefois pas des effets synergiques des métabolites en mélange. Le test d'*Ames* réalisé sur des métabolites de dégradation du pyrène, du fluoranthène et du

phénanthrène par *Mycobacterium* sp. SNP11 a aussi indiqué la disparition du potentiel génotoxique au fil de la dégradation (Pagnout et al., 2006).

Les travaux sur la biodégradation des HAP par les mycobactéries (en milieu liquide) ont rendu compte de la formation de quinones issues de l'oxydation non-enzymatique de dihydroxy-HAP, de *trans*-dihydrodiols résultant de l'époxydation des HAP par des complexes enzymatiques monooxygénase à cytochrome P-450 et de méthoxy-hydroxy dérivés (Heitkamp et al., 1988; Moody et al., 2001). Une catéchol-*O*-méthyltransférase a récemment été isolée à partir du cytosol de *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (Kim et al., 2004) suggérant que cette enzyme jouerait un rôle dans la détoxification des catéchols en générant moins de composés réactifs méthoxy-dérivés. Cette méthylation pourrait aussi limiter l'accumulation de quinones ou d'époxydes dans le milieu de culture. Dans les sols, ces composés peuvent également être métabolisés par d'autres souches bactériennes : on parle alors de *consortium* bactérien de dégradation (Cerniglia, 1992; Liu et al., 1992). Ces métabolites sont rapidement minéralisés dans un sol oxygéné ou peuvent se lier à la matière organique du sol (résidus liés), n'étant alors plus biodisponible en l'état (Aprill & Sims, 1990; Neff et al., 2005).

La photoactivation des HAP donne également lieu à la formation d'« oxy-HAP » dont la distribution dans l'environnement et la toxicité constituent un risque réel pour l'environnement (Xie et al., 2006). Le phénanthrène, l'un des HAP les plus ubiquistes, est rapidement (demi-vie de 48h dans l'atmosphère) converti en phénanthroquinone (Peters et al., 2007). Ce dernier est responsable de la production de ROS (Peters et al., 2007) et/ou de l'inhibition de la chaîne de transport des électrons (Babu et al., 2001). Au niveau des sols, le stress oxydant, résultant de la saturation des systèmes cellulaires impliqués dans la neutralisation des ROS (catalase, superoxyde dismutase ou SOD), peut être accentué par la présence de métaux, co-contaminants fréquents dans les sols de friches pollués par des hydrocarbures (Babu et al., 2001). Plusieurs études *in vitro* ont ainsi montré que le cuivre pouvait catalyser les cycles redox du phénanthroquinone (Babu et al., 2001; Yu, 2002). En d'autres termes, la présence du cuivre et d'oxy-HAP pourrait accentuer le stress oxydant et expliquer l'effet synergique de toxicité de certains métaux/oxy-HAP.

## Compartiment végétal

Les mécanismes de toxicité des HAP accentués en présence de métaux et rencontrés au niveau cellulaire à l'échelle bactérienne, sont également susceptibles de se produire dans les cellules et tissus des organismes végétaux, en particulier au niveau racinaire, augmentant la sensibilité des plantes aux micropolluants présents (Babu et al., 2001). Les HAP (en particulier ceux à faibles poids moléculaires et les molécules dérivées de type oxy-HAP) peuvent pénétrer au niveau des membranes cellulaires après diffusion passive dans la solution du sol (Chaineau et al., 1997), inhiber la chaîne de transport des électrons et l'activité photosynthétique (Mallakin et al., 2002) et diminuer l'efficacité d'approvisionnement en eau et en nutriments (Reilley et al., 1996; Salanitro et al., 1997).

La toxicité des HAP, traduite *in fine* par les effets sur le développement et la croissance végétale, est généralement dépendante de la concentration en polluants du milieu et de l'espèce considérée. Alors qu'une exposition à faible dose (inférieure à 50 mg/kg de sol sec) peut augmenter la biomasse végétale, réponse physiologique caractéristique aux stress environnementaux communément appelé *hormesis* (Calabrese & Blain, 2005; Calabrese & Blain, 2009; Zhang et al., 2010), de fortes doses peuvent en revanche provoquer une inhibition de croissance ou l'absence totale de germination des plantules (Ma et al., 2010a; Maila & Cloete, 2002). Les réponses physiologiques diffèrent à la fois selon le type de molécule considérée et l'espèce végétale (Sverdrup et al., 2003; Zhang et al., 2010). Sverdrup et ses collaborateurs (2003) ont ainsi reporté une concentration effectrice produisant 20 % (CE<sub>20</sub>) de réduction de poids frais chez les jeunes pousses de *Sinapsis alba*, *Trifolium pratense* et *Lolium perenne* pour des teneurs en HAP variant de 140 à 650 mg/kg pour le fluoranthène, 55 à 380 mg/kg pour le fluorène, 37 à 300 mg/kg pour le phénanthrène et 49 à 1300 mg/kg pour le pyrène (Sverdrup et al., 2003) (Tableau 2). De même, à exposition équivalente, la biomasse de *Panicum bisulcatum* a été réduite en moyenne de 70% par exemple par rapport aux témoins, alors que celle de *Aeschynomene indica* en était augmentée (Lee et al., 2008), confirmant ainsi la toxicité potentielle des HAP chez les végétaux supérieurs.

**Tableau 2 : Estimations des concentrations en fluorène, phénanthrène, fluoranthène et pyrène induisant une inhibition de 50% de la germination et une réduction de 20% du poids frais chez la moutarde (*Sinapsis alba*), le trèfle rouge (*Trifolium pratense*) et l'ivraie vivace (*Lolium perenne*), d'après Sverdrup et al. (2003).**

HAP (solubilité mg/L)		Espèce végétale	Concentration effectrice inhibant de 50% (LC <sub>50</sub> ) la germination des graines (mg/kg)	Concentration effectrice entraînant une réduction de 20% (CE <sub>20</sub> ) du poids frais des plantules
3 cycles aromatiques	Fluorène (1,9)	<i>S. alba</i>	>> 1000	120 (12–220)
		<i>T. pratense</i>	950 (720-1200)	55 (26–83)
		<i>L. perenne</i>	>> 1000	380 (0–1600)
	Phénanthrène (1,1)	<i>S. alba</i>	>> 1000	77 (41–110)
		<i>T. pratense</i>	>> 1000	37 (22–52)
		<i>L. perenne</i>	>> 1000	300 (210–400)
4 cycles aromatiques	Fluoranthène (0,26)	<i>S. alba</i>	>> 1000	650 (260–1000)
		<i>T. pratense</i>	>> 1000	140 (0–478)
		<i>L. perenne</i>	>> 1000	490 (320–670)
	Pyrène (0132)	<i>S. alba</i>	>> 1000	120 (14–220)
		<i>T. pratense</i>	>> 1000	49 (26–71)
		<i>L. perenne</i>	>> 1000	> 1000

#### ***1.1.1.5. Aspects réglementaires de la gestion des sites et sols pollués***

Il n'existe pas en droit français de loi concernant exclusivement les sites et sols pollués. Selon la définition du Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement en 1996, « un site pollué est un site qui, du fait d'anciens dépôts de déchets ou d'infiltrations de substances polluantes, présente une pollution susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou l'environnement » (El Yamani, juillet 2006). Il s'agit en d'autres termes d'un site dont l'état de pollution n'est pas compatible avec les usages constatés ou envisagés, nécessitant la délimitation d'un périmètre géographique concerné par un plan de gestion (MEDD Note ministérielle, 2007).

Deux textes servent de base législative en matière d'intervention sur les sites et sols pollués en plus du Code de l'Environnement : la Loi n° 75-633 du 15 juillet 1975 relative à l'élimination des déchets et à la récupération des matériaux modifiés et celle de 1976 tenant lieu pour les Installations Classées pour la Protection de l'Environnement (ICPE) (Loi n° 76-663 du 19 juillet 1976). La loi « déchets » de 1975 fait obligation à l'exploitant d'un site de prévenir les pollutions et de remettre le site en état en fin d'exploitation : c'est le principe du « pollueur-payeur ».

La politique de gestion nationale est précisée, notamment par la circulaire du 3 décembre 1993 relative à la mise en place d'une politique de traitement et de réhabilitation des sols pollués, et celle du 7 avril 1996 relative à la réalisation de diagnostics initiaux et de l'Évaluation Simplifiée des Risques (ESR). L'ESR utilise des valeurs guides (valeurs de constats d'impacts (VCI) et les valeurs de définition de source-sol (VDSS)) pour noter le degré d'importance de l'impact de la pollution sur les sols (BRGM, 2000; INERIS, 2001). La Circulaire du 10 décembre 1999 fixe plus précisément les objectifs de réhabilitation et introduit le « diagnostic approfondi » ainsi que les Évaluations Détaillées des Risques (EDR) en tant qu'outils d'aide à la décision pour gérer le risque. La politique de réhabilitation des sites s'est ainsi davantage infléchi vers une politique de gestion des risques en fonction des usages que sur l'attachement du degré de pollution intrinsèque.

L'ensemble des outils de gestion de sites et sols pollués a récemment fait l'objet d'une réévaluation par le Ministère de l'Écologie et du Développement Durable (MEDD), basée sur le retour d'expérience. Les conclusions ont donné lieu à la suppression des ESR, EDR, et usages de VCI-VDSS. On retrouvera cependant de nombreuses références à ces valeurs dans les archives concernant l'évaluation des sites industriels anciens. Deux nouvelles démarches de gestion ont remplacé ces approches (Note ministérielle du 8 février 2007) : la démarche d'interprétation de l'état des milieux (IEM) pour les sites déjà urbanisés ou occupés et le plan de gestion pour les sites à urbaniser ou à réhabiliter. Ce dernier intervient lorsque la situation permet d'agir aussi bien sur l'état du site (par des aménagements ou des mesures de dépollution) que sur les usages qui peuvent être choisis ou adaptés (liés à une installation classée ou non, détaillé en annexes de la Note ministérielle de 2007).

### ***1.1.2. Les parcs à cendres***

#### ***1.1.2.1. Généralités***

Si l'application des outils de gestion permet d'évaluer les risques liés aux sites potentiellement pollués, elle fait aussi ressortir la nécessité de prise en considération des sites dégradés résultant d'activités industrielles peu polluantes pour les sols telles que la combustion de charbon à fin énergétique. Bien que l'attention portée au développement des énergies renouvelables soit en constante augmentation, le recours aux sources d'énergies fossiles comme le charbon demeure incontournable dans l'approvisionnement énergétique global (Goumans et al., 1994; Ram & Mastro, 2010; Twardowska et al., 2004). La production mondiale de charbon était ainsi estimée à 3,5 milliards de tonnes par an en 2007, dont la

majeure partie était utilisée dans la production de 38% de l'électricité mondiale (Ram & Masto, 2010). La combustion de charbon bitumeux, sub-bitumeux, d'anthracite ou de lignite dans les centrales thermiques entraîne alors la production de résidus de combustion dont 60 à 88% sont constitués de cendres volantes (Vassilev & Vassileva, 2006). Il s'agit généralement de particules minérales qui sont collectées dans les fumées de combustion puis entreposées dans des terrils ou parcs à cendres (bassins de stockage). Leur production représente plus de 550 millions de tonnes par an au niveau mondial (Goumans et al., 1994; Querol et al., 2001; Twardowska et al., 2004). L'Europe se place au 4<sup>ème</sup> rang des producteurs avec plus de 40 millions de tonnes, derrière la Chine, les Etats-Unis, et l'Inde, respectivement avec 160, 120, 118 millions de tonnes par an (Jala & Goyal, 2006; Ram & Masto, 2010; Twardowska et al., 2004).

En France, le développement des centrales nucléaires et d'autres sources d'énergie comme l'hydraulique a entraîné la fermeture progressive des centrales thermiques qui n'assuraient plus que 5% des besoins nationaux en électricité en 2002 (Dinger & Falcy, 2002). Parmi les 11 sites de stockage et centrales à charbon d'Electricité De France (EDF) encore en activité, deux sont répartis en Lorraine, sur les sites de Blénod et La Maxe. En 2002, le parc de stockage de EDF était estimé à 10 700 000 t dont près de la moitié pour la seule région Lorraine et 250 000 t entreposées sur le site de Richemont (Tableau 3) :

**Tableau 3 : Production et stock des cendres volantes en France (Haber et al., 2003); SURSCHISTE, filiale à part entière de la Société Nationale d'Electricité et de Thermique depuis 1997, est un opérateur commercial et industriel chargé de valoriser les coproduits issus de la combustion du charbon en centrale thermique.**

	<b>EDF</b>	<b>SURSCHISTE</b>
Production 2002	775 000 t	400 000 t
Stocks France	10 700 000 t	10 300 000 t
<b>Stocks Lorraine</b>	<b>4 800 000 t</b>	3 500 000 t
Stocks Carling		3 500 000 t
Stocks Blénod	3 650 000 t	
Stocks La Maxe	900 000 t	
<b>Stocks Richemont</b>	<b>250 000 t</b>	

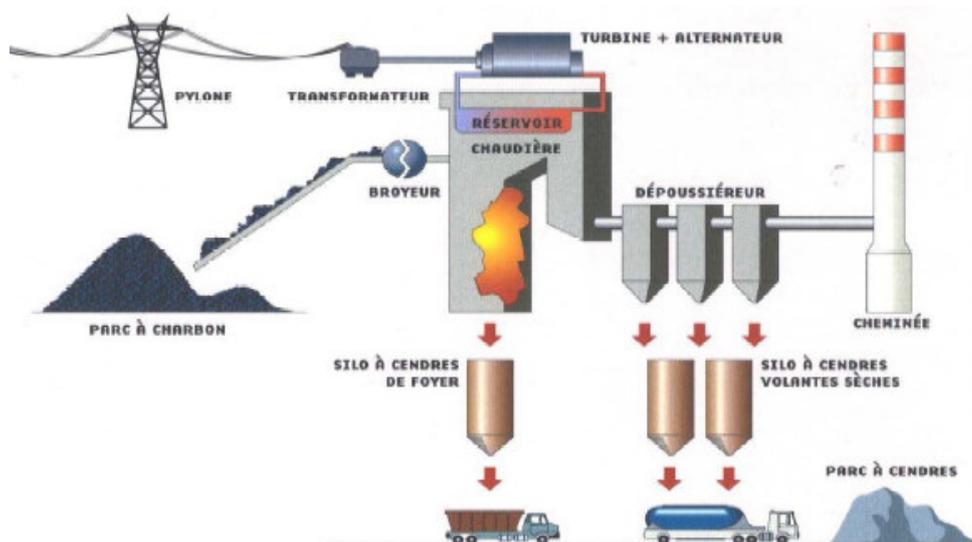
Les programmes de reconversion de sites associés au démantèlement progressif des installations industrielles définissent les conditions de réhabilitation des parcs à cendres. De

manière générale, une partie des cendres « fraîchement » produites peut être valorisée dans l'industrie cimentière (Erdogdu et al., 1998), routière (Kumar et al., 2006) ou la fabrication de céramique (Erol et al., 2000). Pour les anciens stocks non revalorisables directement, d'autres alternatives doivent être envisagées pour éviter l'excavation et le transport des cendres.

Plusieurs études ont proposé la végétalisation de ces parcs à cendres pour les « piéger » au sol et éviter l'érosion éolienne de ces matériaux pulvérulents (Mitrovic et al., 2008; Pandey et al., 2009). L'application de techniques de phytoremédiation, ou plus précisément de phytostabilisation *via* la création de liens entre les particules du substrat et les racines des plantes, permettrait à terme de réduire l'impact des facteurs érosifs (pluie, vent...) tout en intégrant ces espaces à leur environnement naturel (Adriano et al., 1980; Carlson et al., 1993; Djurdjević et al., 2006; Haynes, 2009; Mitrovic et al., 2008; Pandey et al., 2009).

### ***1.1.2.2. Origine et production des cendres***

Les cendres volantes sont issues des centrales thermiques. Il s'agit d'un solide complexe atypique, qui agrège à la fois des propriétés intrinsèques aux gisements de houille dont elles sont issues et des transformations profondes engendrées par l'ensemble des procédés d'utilisation du charbon aboutissant à la production d'électricité (Adriano et al., 1980; Benezet et al., 2008; Vassilev & Vassileva, 2006) (Figure 3).



**Figure 3 : Principe de fonctionnement d'une centrale thermique à charbon ou centrale thermique à flamme (d'après Haber et al. (2003)).**

Le charbon, contenant des stériles (partie rocheuse extraite en même temps que le charbon composée d'environ 70 % de schiste et de grès carbonifère), est pulvérisé et injecté

dans la chambre de combustion des chaudières des centrales thermiques (Figure 3). Ces dernières sont tapissées de tubes dans lesquels circule de l'eau froide. Le dégagement de chaleur issu de la combustion permet de chauffer l'eau. La vapeur d'eau formée est envoyée sous pression vers les turbines qui entraînent un alternateur produisant un courant électrique alternatif. (Figure 3). Une fraction de résidus solides (10 à 15%) se dépose à la base de la chambre de combustion. Il s'agit des cendres de foyer, mâchefers de petites dimensions (30  $\mu\text{m}$  à 30 mm). Le reste (85 à 90%) se dépose d'abord par effet mécanique le long du trajet du gaz en combustion et des fumées, puis est évacué par dépoussiérage électrostatique ou mécanique. Ces poussières sont alors transportées dans des silos de stockage et d'homogénéisation : ce sont les cendres volantes proprement dites (Figure 3). A partir de ces silos, les cendres peuvent être humidifiées (8 à 12% de teneur en eau pour un transport solide ou plus s'il s'agit d'un transport hydraulique) et évacuées vers les bassins de décantation ou parcs à cendres (Afechkar & Nahhass, 2005; Egan, 1976; Haber et al., 2003; Haynes, 2009; Jala & Goyal, 2006).

La centrale d'EDF basée à Richemont (57270) a été créée au début des années 1950 en vue de valoriser les excédents de gaz de hauts fourneaux et d'aciérie produits par les usines de Patural, de Rombas et de Serémange. Depuis leur création et ce jusqu'en 1995, du charbon pulvérisé, essentiellement lorrain, a été utilisé comme combustible complémentaire, entraînant la production de cendres. Dès les années 1960, ces cendres, transportées par voie hydraulique, ont été stockées dans 3 bassins de décantation situés au nord-ouest de l'usine, entre l'autoroute A31 et l'Orne (rapport ANTEA n° A 04542). L'arrêt total des activités a été prononcé en 2008 (BASOL, 2008) et le site est en démantèlement complet depuis 2010.

### ***1.1.2.3. Classification des cendres***

Les cendres représentent par définition les impuretés non-combustibles originellement présentes dans le charbon. Leurs propriétés physico-chimiques et minéralogiques dépendent étroitement de la nature du charbon dont elles sont issues et des processus de combustion subits (Adriano et al., 1980; Benezet et al., 2008; Carlson et al., 1993; Vassilev & Vassileva, 2006). Plusieurs critères de classification ont été proposés, basés sur la teneur en oxydes de silicium, de fer, de calcium, et de magnésium et l'hétérogénéité du matériau (Barthet et al., 2003; Manz, 1999; Ram & Masto, 2010; Vassilev & Vassileva, 2006). En France, elles sont généralement classées en trois catégories (Barthet et al., 2003) :

- les cendres silico-alumineuses, provenant d'un charbon pauvre en calcaire, présentant des propriétés pouzzolaniques : en présence de chaux et d'eau, ces cendres font prise,

conduisant à la formation de composés hydratés insolubles. Cette propriété est par ailleurs utilisée pour l'emploi de ces cendres en couches de chaussées (remblais, couches de forme);

- les cendres sulfo-calciques, issues d'un charbon riche en soufre, présentant des propriétés hydrauliques : en présence d'eau elles font prise comme le ciment;
- les cendres silico-calciques, provenant d'un charbon pauvre en calcaire, mais enrichies suite à l'utilisation de désulfurants calciques. Afin de diminuer l'émission dans l'atmosphère de gaz polluants tel que le dioxyde de soufre, une désulfuration primaire est réalisée par ajout de calcaire ( $\text{CaCO}_3$ ), de chaux vive ( $\text{CaO}$ ) ou de chaux hydratée (hydroxyde de calcium  $\text{Ca(OH)}_2$ ) dans le foyer. Les cendres finalement enrichies en calcium présentent à la fois des propriétés pouzzolaniques et hydrauliques dans des proportions variables.

Les cendres provenant de la houille comportent généralement une forte teneur en silice et en alumine et une faible teneur en chaux et sulfates. C'est le cas des cendres de Lorraine, appartenant donc à la catégorie des cendres dites silico-alumineuses (Haber et al., 2003; rapport ANTEA n° A 04542).

#### ***1.1.2.4. Caractéristiques et propriétés physico-chimiques des cendres***

##### ***1.1.2.4.1. Aspect et structure minéralogique***

Du point de vue morphologique, les cendres volantes sèches se présentent sous forme d'une poudre fine et veloutée, analogue à une poudre de ciment. L'observation microscopique (photonique) révèle un mélange de grains de formes et de couleurs variées, en majorité sphériques, lisses et brillants (Afechkar & Nahhass, 2005; Benezet et al., 2008; Cereda et al., 1995; Vassilev & Vassileva, 2006). D'un point de vue minéralogique, il existe une partie vitreuse souvent prépondérante (phase amorphe unique réactive, *i.e.* verre silico-alumineux) et une partie cristallisée (phases cristallisées inertes, *i.e.* mullite, quartz et magnétite); (Afechkar & Nahhass, 2005; Benezet et al., 2008; Cereda et al., 1995; Vassilev & Vassileva, 2006). Les verres silico-alumineux exposés à l'air libre ont la propriété de s'altérer au fil des années pour se transformer en argiles non cristallines qui peut être bénéfique en fixant activement les métaux lourds, soit en les encapsulant, soit en les intégrant directement à leur structure (Benezet et al., 2008; Cereda et al., 1995). La formation d'oxyhydroxydes de fer (goethite) résultant des interactions cendres-eau participe aussi à l'immobilisation de métaux potentiellement phytotoxiques (Leckie et al., 1980).

#### ***1.1.2.4.2. Finesse des grains***

Les cendres volantes sont constituées d'un mélange de particules magnétiques et non-magnétiques fines à ultrafines, dont les dimensions s'échelonnent de 0,5 à 200  $\mu\text{m}$  (Baba & Alper, 2002; Khandkar et al., 1993). La surface spécifique Blaine (mesure de la finesse de broyage en  $\text{cm}^2/\text{g}$  par perméabilité à l'air) est le plus souvent comprise entre 2200 et 4500  $\text{cm}^2/\text{g}$ . Elle est analogue à celle d'un ciment. Le poids d'un mètre cube de cendres sèches en vrac varie, suivant le tassement, de 0,55 à 1,16  $\text{t}/\text{m}^3$  (masse volumique absolue de 2,02  $\text{t}/\text{m}^3$  en moyenne) (Afechkar & Nahhass, 2005; Haynes, 2009; Mishra & Shukla, 1986). La présence majoritaire d'éléments de petite taille ( $< 2 \text{ mm}$ ) peut donner lieu à des phénomènes de compaction et de « cimentation » naturelle de la couche superficielle des dépôts lors d'événements pluvieux. Il en résulte alors une couche de surface difficilement pénétrable par les racines des plantes (Carlson et al., 1993) (Dinger & Falcy, 2002).

#### ***1.1.2.4.3. Comportement à l'eau***

Concernant leur sensibilité à l'eau, les cendres volantes sont hydrophiles (Ghodrati et al., 1995) avec une rétention d'humidité de 6,1 à 13,4%, une conductivité électrique à saturation de l'ordre de 0,63 à 55 deciSiemens/m et une capacité de rétention d'eau de 45 à 60% (Aitken et al., 1984; Sarkar & Rano, 2007). La capacité de rétention d'eau relativement élevée ne traduit cependant pas nécessairement une biodisponibilité en eau accrue pour la plante dans la mesure où l'eau peut être retenue par des forces de capillarités importantes dans les micropores des cendres (Ghodrati et al., 1995).

Le pH varie de 4,5 à 12 mais la majorité des cendres volantes produites dans le monde sont alcalines (Adriano et al., 1980; Ram & Mastro, 2010; Ram et al., 2006). Cela a une influence directe sur la biodisponibilité des éléments traces métalliques qui tendent à précipiter ou à fortement s'adsorber au sol en conditions basiques (Carlson et al., 1993). Par ailleurs, les lessivages successifs des couches superficielles des dépôts de cendres en terrils participent au « vieillissement » du substrat, ce qui se traduit par une diminution du pH facilitant l'installation progressive d'un couvert végétal (Adriano et al., 1980; Dinger & Falcy, 2002).

#### ***1.1.2.4.4. Composition chimique élémentaire***

D'un point de vue élémentaire, 90 à 99% des cendres volantes sont constituées d'atomes de Si, Al, Fe, Ca, Mg, Na et K; principalement présents sous forme d'oxydes

(Tableau 4) (Afechkar & Nahhass, 2005; Benezet et al., 2008; Carlson et al., 1993; Vassilev & Vassileva, 2006).

**Tableau 4 : Composition chimique relative (% moléculaire) des cendres volantes silico-alumineuses (Afechkar & Nahhass, 2005).**

Oxydes	Pourcentage de la fraction totale (%)
SiO <sub>2</sub>	43 - 54
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	22 - 32
FeO <sub>3</sub> et TiO <sub>2</sub>	4 - 15
CaO	1 - 8
MgO	1 - 3
K <sub>2</sub> O	2 - 5
Na <sub>2</sub> O	0,5 - 1
SO <sub>3</sub>	0,2 - 2

Les cendres contiennent aussi des éléments assimilables comme le P, B, Cu, Zn, Mn et d'autres éléments traces métalliques qui sont généralement lessivés dans les cendres « vieilles » (stockées dans les parcs à cendres), et radioisotopes (de la série de <sup>238</sup>U, <sup>232</sup>Th, et <sup>40</sup>K) (Aitken et al., 1984; Furr et al., 1977; Jankowski et al., 2006). La disponibilité de Mg, Mo, S et Zn dans certains types de cendres est comparable à celle des engrais (Elmogazi et al., 1988). Les cendres volantes, de part leur teneur relative en macro et micronutriments (K, Ca, Mg, S, P) sont utilisées en amendements de certaines terres agricoles et en foresterie (Jala & Goyal, 2006; Rees & Sidrak, 1956; Yunusa et al., 2006).

La plupart des nutriments essentiels à la croissance des végétaux est donc présente, excepté l'azote, qui est oxydé en même temps que le carbone durant la combustion du charbon. L'absence de teneur suffisante en azote ou la non-biodisponibilité d'autres éléments selon leurs formes chimiques peut limiter la recolonisation du milieu par les espèces végétales locales (Pandey et al., 2009).

#### ***1.1.2.4.5. Composition en imbrûlés***

La combustion n'étant jamais complète, il peut subsister une fraction « grossière » de charbon entraînée avec les cendres (Veranth et al., 2000). La matrice ferro-aluminosilicatée des grains comprend une proportion variable de carbone non brûlé inclu dans des phases minérales de quartz, mullite, hematite, ou magnetite (Tripathy & Sahu, 1997). La teneur en imbrûlés peut varier de 1 à 6%, allant jusqu'à 10% en présence d'un charbon pauvre en

matières volatiles (Afechkar & Nahhass, 2005; Haynes, 2009). La teneur en carbone organique des cendres « vieilles » est également plus élevée que celles directement issues des centrales de production (Khandkar et al., 1993).

#### ***I.1.2.4.6. Teneurs en micropolluants***

La teneur en éléments traces métalliques (ETM), volatilisés lors de la combustion puis re-condensés à la surface des particules, est inversement proportionnelle à la taille de ces dernières. Parmi les ETM fréquemment rencontrés, on peut citer : Cr, V, Mo, Mn, Ni, Co, Cu, Pb, Zn, Ti (Bogdanovic et al., 1995; Cereda et al., 1995; Lecuyer, 1995). La composition varie toutefois en fonction de la provenance du charbon. Les concentrations en Zn, Cu, Ni, Cr et V sont plus élevées dans les cendres dérivées du lignite que celles issues du charbon bitumeux et sub-bitumeux (Sadasivan & Negi, 1991). Ces éléments-traces métalliques ont un potentiel d'inhibition de germination ou de développement des plantules plus ou moins important en fonction des espèces considérées (Haynes, 2009). L'élément le plus problématique dans les cendres de par sa phytotoxicité, est le bore (B) pour lequel des concentrations de l'ordre de 20 à 60 mg/kg sont couramment retrouvées, alors que 30 mg/kg est considéré comme une dose très toxique (Bradshaw, 1997). Cependant, la mobilité des métaux associée au fort lessivage des couches superficielles des cendres en dépôts permet généralement d'atteindre des conditions physico-chimiques favorables à la croissance des plantes au bout de 2 à 3 ans de « vieillissement » (Carlson et al., 1991). La bioaccumulation de certains éléments non toxiques pour la croissance des plantes comme Se, Mo, et As et leur biomagnification dans la chaîne alimentaire lorsque les cendres sont utilisées dans des contextes agricoles est davantage problématique (Carlson et al., 1991; Haynes, 2009; Tolle et al., 1983).

Dix-neuf hydrocarbures aliphatiques ont aussi pu être détectés dans des cendres volantes directement sorties du collecteur électrostatique dans une centrale thermique aux Etats-Unis (Higgins et al., 1983). Les hydrocarbures aromatiques présents sont essentiellement le benzène, l'éthylbenzène, le toluène, le xylène (BETX) (Fernandez et al., 2001). Les hydrocarbures chlorés ont généralement des concentrations inférieures aux seuils de détection (Fernandez et al., 2001).

### ***1.1.2.5. Processus pédogénétiques de « vieillissement » du substrat***

L'étude des substrats composés de cendres volantes de lignite et de cendres volcaniques témoignent de propriétés chimiques similaires, bien que les premières puissent contenir des quantités inhabituelles de carbonates de gypse (formation de gypse artificiel pour limiter la production atmosphérique de SO<sub>2</sub> par combustion de lignite), de calcium, de magnésium, et de carbone organique en fonction du charbon initial (Zikeli et al., 2005). Les phénomènes de « vieillissement » ou de désagrégation des cendres de lignite sont toutefois considérablement plus rapides que ceux des cendres volcaniques (Warren et al., 1985; Zevenbergen et al., 1999). La proportion en argiles non cristallins est beaucoup plus importante dans des cendres de lignite après 10 ans de vieillissement seulement qu'elle ne l'est dans des cendres volcaniques âgées de plus de 250 ans (Zevenbergen et al., 1999). L'origine de cette transformation rapide résiderait dans le pH initialement très alcalin des cendres industrielles (pH 11 à 12), entraînant la dissolution accélérée des verres d'aluminosilicates. Parallèlement à ce processus, la transformation des oxydes de calcium (chaux vive (CaO) et gypse (CaSO<sub>4</sub>)) initialement présents dans les cendres volantes en carbonate de calcium ou calcite (CaCO<sub>3</sub>), par une série de réactions faisant intervenir le CO<sub>2</sub> atmosphérique (ou issu de la respiration microbienne) entraîne une diminution du pH aux environs de 7 à 8 (Schramke & J, 1992). Cette acidification entraîne la précipitation du silicium et de l'aluminium dissous en composés d'aluminosilicates amorphes. Ces composés ont une plus grande capacité d'adsorption de cations et d'anions que la forme cristalline étant donné leur plus grande surface active. Une des conséquences de cette formation d'argiles est l'enrobage des particules de cendres qui agissent ensuite comme adsorbant pour d'éventuels contaminants (métaux lourds). Il en découle aussi une barrière physique contre le lessivage de certains nutriments. Ces argiles peuvent également réagir avec la matière organique issue de la revégétalisation du site en séquestrant une partie du carbone organique (Zikeli et al., 2002, 2005). Une relation directe a pu être montrée entre l'abondance du couvert végétal sur les dépôts de cendres et la concentration en composés polyphénoliques totaux (précurseurs dans la formation de substances humiques constituant la matière organiques des sols) (Djurdjević et al., 2006). Il peut en résulter une accumulation rapide de la matière organique, influençant aussi la biodisponibilité en nutriments associée au développement d'importantes communautés microbiennes (Machulla et al., 2004; Zikeli et al., 2004). Ces dernières peuvent en retour modifier les propriétés physico-chimiques du sol et promouvoir la croissance des végétaux. La désagrégation initiale des cendres associée à la déposition de matières

organiques au cours de la revégétalisation conduit en définitive à la formation progressive d'un substrat dont les propriétés physico-chimiques et biologiques diffèrent largement de celles des cendres sorties d'usine (Zikeli et al., 2002, 2005).

#### ***1.1.2.6. Evaluation écotoxicologique***

En 1999, EDF a mené une série d'études écotoxicologiques en France sur plusieurs cendres volantes de type silico-alumineuses et silico-calciques réalisées selon le critère H14 du MATE (Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, devenu Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable; circulaire du 4 février 2002, «critère H14 : caractérisation et classification des déchets à des fins de valorisation») pour la classification de la dangerosité des déchets. Les tests utilisés – test daphnies 48H, MICROTOX 30 min, test algues 72H, test Cériodaphnies 7 jours, test d'Ames (mutagénicité), croissance de l'orge et du colza 14 jours, test vers de terre 14 jours- ont montré l'absence d'écotoxicité directe et indirecte des lixiviats des cendres volantes de fraîche production et de cendres stockées dans des terrils ou des bassins (Barthet et al., 2003).

Des essais de culture de la bactérie *Thiobacillus thiooxidans* dans un milieu contenant jusqu'à 10% (poids/volume) de cendres volantes ont montré une inhibition du taux de croissance puis une adaptation de la souche et un retour à un taux de croissance équivalent au témoin après trois semaines d'exposition. Grâce à la production de substances polymériques extracellulaires en quantité trois fois plus importantes que pour le témoin, les bactéries ainsi adaptées pouvaient alors adhérer aux cendres (Seidel et al., 2001).

#### ***1.1.2.7. Evaluation simplifiée des risques du site EDF Richemont***

Concernant la centrale de EDF à Richemont, dans le cadre du contrat cadre EDF-MEDD (Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable), l'évaluation simplifiée des risques (ESR) a mis en évidence plusieurs zones contaminées (pollution en métaux, hydrocarbures, polychlorobiphényles) : ancienne décharge, anciens parcs à cendres, parc à ferrailles, zone de dépôts, fosses à hydrocarbures. L'ESR range le site en classe 2 (« à surveiller » pour un usage non sensible) vis-à-vis du contact direct sol et de l'utilisation des eaux superficielles pour usage non AEP (Alimentation en Eau Potable) (BASOL, 2008).

A la date du 13 décembre 2007, toutes les concentrations mesurées dans les eaux souterraines sont conformes aux valeurs limites. Aucune action corrective n'est à prescrire au

regard de ces résultats, la surveillance de la nappe doit cependant être maintenue (BASOL, 2008).

### ***1.1.2.8. Aspects réglementaires***

La réglementation européenne classe les cendres de charbon comme des déchets industriels non dangereux (liste verte (OCDE, 2001) inscrits au catalogue européen des déchets (Haber et al., 2003) :

- 10 01 01 pour les mâchefers
- 10 01 02 pour les cendres volantes de charbon.

En France, aucune réglementation spécifique n'est établie pour les cendres. Leur utilisation est régie par la circulaire n°96-85 du 11 octobre 1996, relative aux cendres issues de la filtration des gaz de combustion de combustibles d'origine fossile dans les Installations Classées pour la Protection de l'Environnement (ICPE) (Circulaire n° 96-85 du 11 octobre 1996). Les cendres de charbon y sont considérées comme des déchets inertes, potentiellement non dangereux ni écotoxiques et autorise une valorisation sans contraintes pour béton et cru de cimenterie. L'utilisation dans d'autres voies de valorisation nécessite une évaluation de l'impact environnemental, du fait de la présence d'éléments traces métalliques (Circulaire n° 96-85 du 11 octobre 1996).

## **I.2. Réhabilitation des sols dégradés**

### **I.2.1. Généralités**

Selon le degré de pollution des sols de friches industrielles et du risque qu'ils représentent directement pour la santé humaine et les écosystèmes, des techniques particulières de dépollution et/ou de confinement doivent être mises en œuvre. Il n'existe aucune méthode de remédiation « universelle » applicable à tous les sols pollués (Gan et al., 2009). De nombreux paramètres sont à prendre en compte, nécessitant un diagnostic préalable : type de polluant, contamination récente ou ancienne, extension en surface ou dans les couches profondes du sol, diversité des conditions locales (nature du sol, localisation des nappes phréatiques, proximité de zone urbaine...). La dépollution peut être mise en œuvre à

travers quatre grands types de méthodes, associant éventuellement la combinaison de plusieurs techniques (Gan et al., 2009; Naidu, 2003) :

- les méthodes physiques consistent à transférer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire, en se servant de fluides (eau ou gaz) pour le transport (annexe 2)
- les méthodes thermiques consistent à chauffer le matériel contaminé pour en extraire le polluant et le détruire (annexe 2)
- les méthodes chimiques, font appel à un principe réactionnel (action d'un solvant, oxydation, etc) pour transformer le polluant en un composé moins toxique et inerte vis-à-vis de l'environnement (annexe 2)
- les méthodes biologiques favorisent quant à elles, la dégradation naturelle des contaminants (annexe 2).

Toutes ces techniques peuvent être mises en œuvre *ex situ* (excavation des sols contaminés et traitement "hors site" ou "sur site") ou *in situ* (décontamination sans excavation). Elles sont préférées pour traiter des sites encore en activité ou lorsque la zone polluée est trop étendue pour avoir recours à l'excavation (Bennett, 1995; Romantschuk et al., 2000). Parmi les différentes techniques existantes, la bioremédiation, grâce à l'action de microorganismes à capacité de dégradation ou de séquestration des polluants, offre l'avantage de préserver les propriétés biologiques et fonctionnelles des sols. La phytoremédiation, basée sur l'exploitation des effets synergiques résultants de l'association des microorganismes avec les racines des plantes, constitue une avancée biotechnologique à moindre coût, tout en minimisant l'intervention de l'homme (Cunningham et al., 1993; Gerhardt et al., 2009). Par ailleurs, la phytoremédiation, de part l'établissement d'un couvert végétal et du développement racinaire, représente un moyen de lutte efficace contre les phénomènes érosifs, tout en favorisant la circulation des nutriments impliqués dans les cycles biogéochimiques (Cunningham et al., 1993; Fernando et al., 2004; Gerhardt et al., 2009).

## **I.2.2. Bioremédiation des sols pollués par les HAP**

### ***I.2.2.1. Biodégradation bactérienne***

Des voies métaboliques de dégradation des HAP ont été mises en évidence pour l'ensemble des communautés microbiennes : bactéries, champignons et algues (Brooijmans et al., 2009; Cerniglia, 1992; Field et al., 1992; Sack & Günther, 1993; Safonova et al., 2005).

Ces capacités sont à mettre en relation directe avec la présence naturelle et ubiquiste de ces composés dans l'environnement (Brooijmans et al., 2009; Wilcke, 2007).

La dégradation bactérienne en aérobiose constitue le processus majeur de minéralisation des HAP dans les sols (Cerniglia, 1992; Cerniglia, 1984; Haritash & Kaushik, 2009; Kanaly & Harayama, 2000; Samanta et al., 2002). Certaines souches sont ainsi capables de croître en utilisant uniquement des HAP de faible poids moléculaire (2 à 3 cycles aromatiques) comme source de carbone et d'énergie (Churchill et al., 1999; Dean-Ross et al., 2002; Demaneche et al., 2004). Sous certaines conditions, une dégradation anaérobie peut aussi se produire, notamment en présence des ions nitrates, ferreux ou sulfates qui assurent le rôle de réducteur dans les biodégradation anaérobie de HAP comme le naphthalène, le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène et le pyrène (Chang et al., 2002; McNally et al., 1999; Rockne & Strand, 1998).

La diversité des bactéries impliquées dans les processus de biotransformation est très importante, regroupant presque tous les clades phylogénétiques (Samanta et al., 2002). La caractérisation des enzymes de dégradation, ainsi que la localisation et la régulation des gènes codant pour ces enzymes, fournissent autant d'informations permettant de comprendre : i) comment les bactéries s'adaptent aux xénobiotiques, ii) comment les plantes pourraient favoriser la capacité de ces bactéries à dégrader les polluants dans le cadre de la phytoremédiation.

#### ***1.2.2.1.1. Diversité et dynamique des populations dégradantes***

Les travaux menés sur la bioremédiation des sols durant les deux dernières décennies ont permis l'isolement et l'identification d'une grande variété de souches capables de métaboliser les HAP. Cette diversité regroupe aussi bien des bactéries « Gram négatives » (Gram (-)) que des bactéries « Gram positives » (Gram (+)), (Tableau 5).

**Tableau 5 : Principaux genres bactériens dégradants isolés à partir des sols.**

Gram	Clades	Genres	Références
Gram (-)	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Sphingomonas, Achromobacter, Agrobacterium</i>	(Haritash & Kaushik, 2009; Romine et al., 1999)
	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Alcaligenes, Burkholderia, Comamonas, Polaromonas, Ralstonia, Rhizobium</i>	(Daane et al., 2001; Goyal & Zylstra, 1996; Jeon et al., 2006; Larkin et al., 1999)
	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas, Acinetobacter, Klebsiella, Stenotrophomonas, Haemophilus</i>	(Abd-Elsalam et al., 2006; Haritash & Kaushik, 2009; Kim et al., 2009; Simon et al., 1993)
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i>	(Abd-Elsalam et al., 2006)
Gram (+)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter; Rhodococcus Micrococcus, Mycobacterium, Terrabacter, Gordonia</i>	(Heitkamp et al., 1988; Kästner et al., 1994; Khan et al., 2002; Krivobok et al., 2003; Larkin et al., 1999; Timmis et al., 2010)
	<i>Nocardioides</i>	<i>Nocardia</i>	(Krivobok et al., 2003; Saito et al., 1999; Zeinali et al., 2007)
	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus, Paenibacillus</i>	(Bossert & Bartha, 1986; Daane et al., 2002; Rochelle et al., 2005)

Toutefois, les différentes souches isolées appartiennent souvent à un nombre plus restreint de taxons, comprenant essentiellement les *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (Bastiaens et al., 2000; Ho et al., 2000; Johnsen et al., 2002; Kästner et al., 1994; Leys et al., 2004; Mueller et al., 1997). Les *Sphingomonas* et les *Actinomycètes*, semblent être les microorganismes les plus versatiles concernant la dégradation des HAP à « haut poids moléculaire » (Kanaly & Harayama, 2010). Bien que la prédominance de ces souches bactériennes puisse être le résultat des méthodes d'enrichissement et d'isolement utilisées, plusieurs traits écophysologiques communs leur confèreraient un avantage adaptatif face aux conditions oligotrophiques dans les sols : production de tensioactifs et systèmes de transport facilitant l'absorption des HAP, grande « versatilité » catabolique (Bastiaens et al., 2000; Daane et al., 2001; Gaskin & Bentham, 2005; Stach & Burns, 2002).

La production de biosurfactants, *i.e.* rhamnolipides (*Pseudomonas*) (Johnsen & Karlson, 2004), d'émulsifiant-stabilisant, *i.e.* Alasan, (*Acinetobacter*) (Barkay et al., 1999), d'exopolysaccharides spécifiques, *i.e.* Sphingan (*Sphingomonas*) (Coppotelli et al., 2009; Dworkin et al., 2006; Johnsen & Karlson, 2004), d'acides mycoliques pariétaux (*Mycobacterium*) (Wick et al., 2002) sont autant de facteurs favorisant l'assimilation de

substances très hydrophobes comme les HAP, et la formation de biofilms à la surface des cristaux lorsque les polluants sont précipités (Coppotelli et al., 2009; Davey & O'Toole, 2000). A ces adaptations, s'ajoutent des systèmes de transport à haute affinité chez les *Mycobacterium*, *Arthrobacter* et *Rhodococcus* (Bouchez et al., 1997; MacLeod & Daugulis, 2005; Wick et al., 2002), des mécanismes d'endocytose spécifiques chez les *Sphingomonas* (Momma et al., 1999) ou des processus de chimiotactisme vis-à-vis des HAP reportés chez les *Pseudomonas* (Marx & Aitken, 1999; Ortega et al., 2003).

Le potentiel métabolique intrinsèque des groupes cités est aussi un des paramètres explicatifs de la prévalence de certains genres. Les *Pseudomonas* sont par exemple connus pour leurs capacités à métaboliser une grande variété d'hydrocarbures aromatiques (toluène, m-xylène, naphthalène, phénanthrène) avec un nombre restreint d'enzymes, sans exposition préalable aux polluants (Clarke, 1982; Rojo, 2010). Les *Sphingomonas* sont également étudiés pour le catabolisme de molécules cycliques de type biphényle (substitué ou non), organochlorés, dioxines, œstradiol, ainsi que de différents pesticides (Basta et al., 2005).

En considérant la grande hétérogénéité spatiale des ressources nutritives dans les sols, l'utilisation conjointe de divers composés carbonés biodisponibles apparaît comme une stratégie de survie pour le maintien des populations microbiennes (Johnsen et al., 2005). Un niveau d'expression « basal » des enzymes métabolisant les HAP est souvent suffisant pour une consommation immédiate du polluant : il n'y aurait pas obligatoirement de concentration « critique » en HAP en-deçà de laquelle toute biodégradation cesserait (Johnsen et al., 2005). Cependant, pour que ce trait phénotypique soit stable au sein de la population, le coût énergétique de synthèse des enzymes dégradantes doit toujours être compensé par un avantage adaptatif conduisant à l'enrichissement sélectif de communautés bactériennes dégradantes ou à la prévalence de certains gènes de dégradation (arènes dioxygénases de *Mycobacterium* par exemple) (Johnsen & Karlson, 2005).

Des phylotypes spécifiques peuvent aussi être associés aux différentes phases de biodégradation des HAP ou à la présence d'autres sources de nutriments dans les sols : exsudats racinaires, compost, amendements en azote, phosphore (Corgié et al., 2006; Di Gennaro et al., 2009; Kaplan & Kitts, 2004; Peng et al., 2010; Sipila et al., 2008; Vinas et al., 2005). Certains phylums bactériens, classés en groupes copiotrophes, seront favorisés quand les ressources sont abondantes, et, au contraire, les groupes oligotrophes pourront croître et survivre avec des ressources limitées : ces groupes correspondent respectivement aux espèces à stratégies « r » et « K » classiquement définies en biologie des populations (Fierer et al., 2007). Par exemple, la minéralisation de sources de carbone rapidement biodisponibles dans

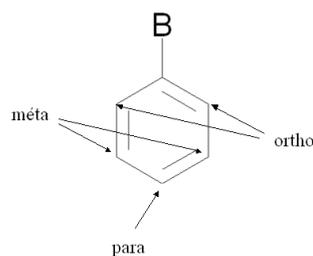
les sols, incluant les sols rhizosphériques, a été positivement corrélée à l'abondance de *β-Proteobacteria* et *Bacteroidetes*, et négativement à celle d'*Acidobacteria* (Fierer et al., 2007). Les phases initiales de dégradation rapides des HAP sont souvent associées à la croissance d'espèces de type « r » (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*), laissant place au fil de la diminution de l'accessibilité des ressources à des espèces à croissance plus lentes, de type *Alcaligenes*, *Microbacterium*, *Bacteroidetes* et certains *Actinobacteria* (Kaplan & Kitts, 2004). Certains genres, comme par exemple *Pseudomonas*, *Achromobacter* (Gram (-)) ou *Arthrobacter* (Gram (+)) sont souvent retrouvés en plus grandes proportions dans le compartiment rhizosphérique des sols contaminés (Walton Barbara et al., 1994).

Enfin, la quantité mais aussi le type de HAP présents (nombre de cycles) influent sur la structure initiale des communautés bactériennes présentes dans les sols (Walton Barbara et al., 1994). La prévalence d'un groupe particulier de bactéries dégradantes peut également être fonction de la texture du sol, avec par exemple la dominance d'*Actinobacteria* (*Rhodococcus s.p.*) reportée dans des sols argilo-limoneux pollués (Hamamura et al., 2006).

Différentes stratégies adaptatives sont employées, résultant en une dynamique particulière des phylums bactériens, permettant aux microorganismes d'accéder aux ressources en dépit des limitations physiques de transferts de masse (liées à la faible solubilité des HAP en milieu aqueux). La biodisponibilité des HAP ne se traduit pas nécessairement par leur passage en phase aqueuse. Cela implique qu'en l'absence de dissipation des HAP dans les sols, d'autres phénomènes explicatifs que l'absence de biodisponibilité, sont à prendre en compte. Afin de mieux appréhender ce nouvel aspect, il apparaît donc nécessaire de se pencher sur les mécanismes moléculaires de biodégradation des HAP.

#### ***1.2.2.1.2. Biodégradation oxydative des HAP : aspects métaboliques***

La première étape dans le catabolisme aérobie des HAP consiste en l'action d'enzymes de type monooxygénase ou dioxygénase, qui vont incorporer un ou deux atomes d'oxygène au niveau d'un cycle aromatique (généralement terminal). Il en résulte l'hydroxylation de ce cycle et l'activation biochimique de la molécule (Cerniglia, 1992). La substitution sur la molécule de HAP par deux groupements hydroxyles peut se faire en position *ortho* (comme dans les molécules de catechol ou protocatechol) ou *para* (comme dans les molécules de gentisate ou homogentisate) (figure 4).



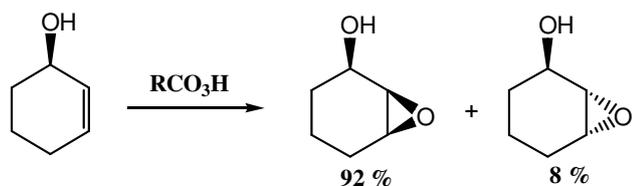
**Figure 4 : Nomenclature des positions du benzène substitué (régions spécifiques).**

Cette substitution aboutit à la formation de cis-dihydrodiols (Figure 6). Il y a ensuite clivage ou « fission » de ces noyaux aromatiques en *ortho* des groupes hydroxyles (clivage entre les carbones porteurs des groupements hydroxyles) ou en *méta* (clivage entre les deux carbones adjacents au diol) par action d'une seconde dioxygénase. D'autres réactions d'oxydations suivies de ruptures progressives des cycles ont lieu, jusqu'à aboutir à des intermédiaires métaboliques dihydroxylés de type catéchols ou protocatéchols. Ces molécules sont par la suite converties en intermédiaires du cycle de l'acide tricarboxylique (Figure 6 : MX, OVIII, OIX, BV, BVI) (Cerniglia, 1992; Eaton & Chapman, 1992; Gibson & Parales, 2000).

#### **Cas des HAP « légers » (moins de 4 cycles)**

La biodégradation des HAP « légers » se distingue de celle des HAP « lourds », davantage récalcitrants à la biotransformation de par leur stabilité électrochimique et hydrophobicité très élevées (Bossert & Bartha, 1986; Cerniglia, 1992; Heitkamp et al., 1988; Peng et al., 2008). Les bactéries isolées sélectivement en présence de HAP « légers », sont souvent incapables de dégrader les HAP à 4 cycles et plus. En effet, les enzymes impliquées dans les deux cas sont généralement différentes.

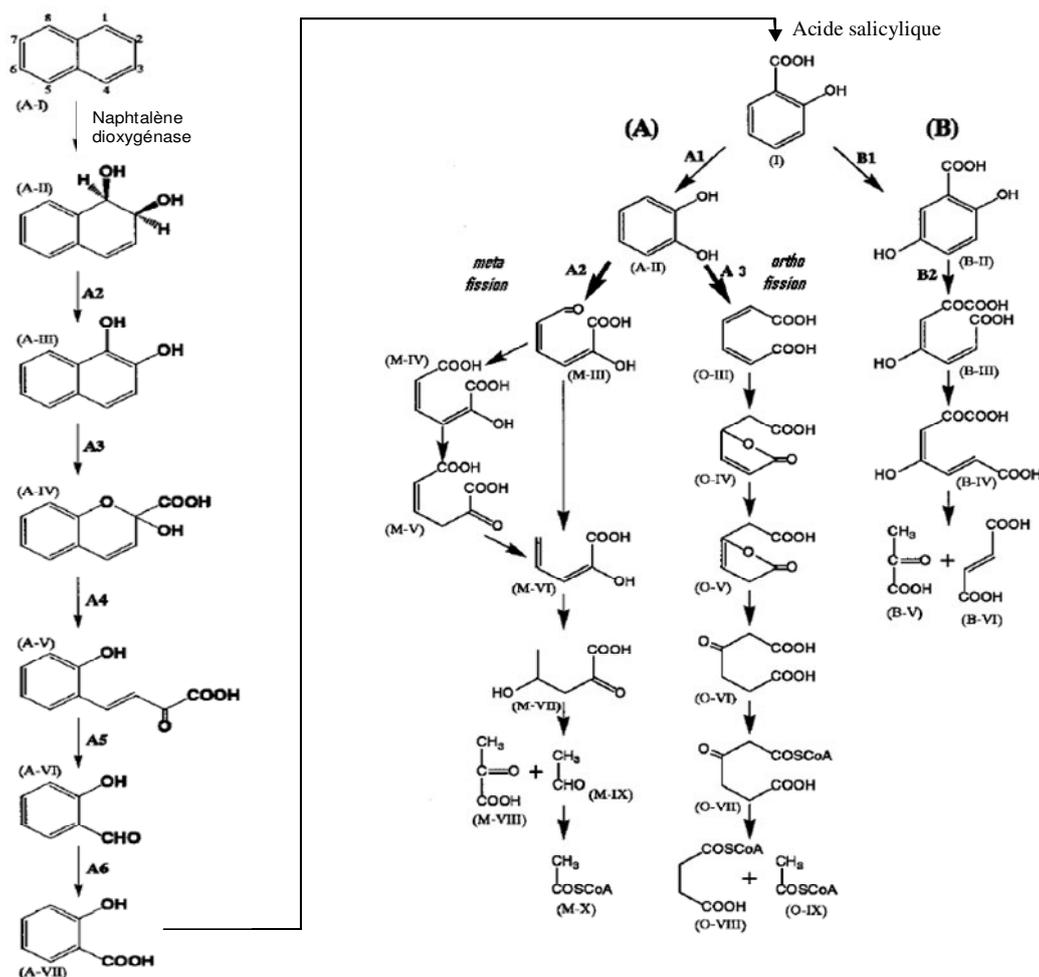
Les dioxygénases catalysent des réactions d'oxydation stéréo- et régiosélectives, imposées par la configuration du site actif de l'enzyme qui conditionne directement la fixation et l'orientation de la molécule de substrat (Peng et al., 2008). La réaction chimique est dite stéréosélective lorsqu'à partir d'un réactif quelconque (sans stéréochimie particulière), on obtient un ou plusieurs stéréoisomères possibles de façon majoritaire (Figure 5). La réaction est qualifiée de régiosélective (cas particulier de la stéréosélectivité) lorsque l'attaque nucléophile a lieu sur une région spécifique de la molécule de substrat (Figure 4), donnant lieu à la formation majoritaire d'un ou plusieurs isomères optiques.



**Figure 5 : Exemple de réaction stéréosélective à partir d'un cycle benzénique substitué (hydroxylé).**

Les dioxygénases sont classées en fonction du substrat qu'elles sont capables d'oxyder, *e.g.* toluène (TDO), naphthalène (NDO) et biphényle (BPDO). Seules les BPDO sont en l'occurrence capables de métaboliser des HAP à 4 cycles et plus (Peng et al., 2008). L'accent sera particulièrement porté dans la suite sur la biodégradation du naphthalène et du phénanthrène, molécules modèles dans l'étude de la dégradation des HAP « légers ». Ces deux molécules figurent en effet parmi les plus représentatives du « bruit de fond » naturel, expliquant probablement que le phénotype de biodégradation de ces HAP soit répandu chez les bactéries (Johnsen & Karlson, 2005; Wilcke, 2007).

**La biodégradation du naphthalène** (2 cycles) a été la première voie de dégradation entièrement décrite (Yen et al., 1988). Le naphthalène est progressivement métabolisé en acide salicylique (Figure 6-I), lequel est finalement converti en catéchol chez la plupart des bactéries. Le catéchol est alors clivé selon les deux voies possibles précédemment mentionnées : en *méta* donnant l'acide 2-hydroxymuconique semi-aldéhyde (Figure 6 MIII) ou en *ortho* donnant l'acide cis, cis-muconique (Figure 6 OIII). D'autres bactéries peuvent aussi convertir le salicylate en acide gentisique (acide 2,5-dihydroxybenzoïque; Figure 6 BII) (Grund et al., 1992).



**Figure 6 : Voies de biodégradation identifiées pour le naphthalène; d'après Cerniglia, 1992; Peng et al., 2008.**

La naphthalène dioxygénase est, par ailleurs, capable d'oxyder le naphthalène, le phénanthrène, l'anthracène, le biphenyle, le dibenzothiophène, le dibenzofurane et l'acridine (Jouanneau et al., 2006; Resnick et al., 1996). L'étude de l'expression génique de cette enzyme au sein des communautés microbiennes pourrait ainsi constituer une mesure indirecte du potentiel de biodégradation des HAP dans les sols : les sondes d'hybridation aux séquences nucléotidiques similaires à celle de la naphthalène dioxygénase peuvent effectivement révéler 45% des phénotypes naphthalène-dégradants et 15% des phénotypes phénanthrène-dégradants, suggérant l'existence d'une très grande variété de voies métaboliques (dûe à d'autres activités enzymatiques) restant à identifier dans les sols (Laurie & Lloyd-Jones, 2000; Lloyd-Jones et al., 1999). D'autres gènes codant pour des enzymes impliquées dans les processus d'hydroxylation d'autres HAP, comme la phénanthrène 2,3 dioxygénase, ou d'intermédiaires métaboliques communs aux voies de biodégradation, comme les catéchols dioxygénases, peuvent aussi être ciblés (Cébron et al., 2008).

**En ce qui concerne le phénanthrène** (3 cycles), deux voies de biodégradation ont été entièrement décrites. Dans la première voie, l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque (intermédiaire de dégradation à 2 cycles) est oxydé en 1,2-dihydroxynaphtalène (Figure 6 AIII). Cette voie, retrouvée chez les bactéries Gram (-), en particulier *Pseudomonas*, rejoint ensuite la voie de dégradation du naphtalène (Figure 6). Dans la deuxième voie, décrite chez des bactéries Gram (+) comme *Mycobacterium*, *Nocardioïdes*, ou *Aeromonas*, l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque subit une série de réactions aboutissant à la formation d'une molécule de phtalate à la place de la molécule de catéchol (Figure 7) (Habe & Omori, 2003; Moody et al., 2001; Saito et al., 1999). La voie de dégradation du phtalate emprunte ensuite celle du béta-kétoadipate pour conduire à la formation d'intermédiaires du cycle de l'acide tricarboxylique (Figure 7) (Habe & Omori, 2003; MacLean et al., 2006). Ces bactéries sont souvent moins efficaces dans la dégradation du naphtalène (Habe & Omori, 2003).

#### **Cas des HAP « lourds » (4 cycles et plus)**

Les études sur la biodégradation des HAP à 4 cycles ont connu des avancées significatives depuis la caractérisation de la première souche capable de croître sur le pyrène comme unique source de carbone et d'énergie (*Mycobacterium vanbaalenii* *PYR-1*) (Heitkamp et al., 1988; Khan et al., 2002). Depuis, de nombreuses autres souches bactériennes ont été isolées pour leur capacité à utiliser uniquement le pyrène, le benzo(a)anthracène, le chrysène ou encore le fluoranthène (Chauhan et al., 2008; Juhasz & Naidu, 2000; Juhasz et al., 2000; Kanaly & Harayama, 2010; Samanta et al., 2002). Des actinomycètes des genres *Mycobacterium* (Bogan et al., 2003; Boldrin et al., 1993; Heitkamp et al., 1988), *Rhodococcus* (Bouchez et al., 1995) ou *Gordonia* (Kästner et al., 1994) et des espèces Gram (-) comme *Pseudomonas* (Boonchan et al., 1998; Juhasz et al., 1996), *Sphingomonas* (Kastner et al., 1998), *Burkholderia* (Juhasz et al., 1997), *Stenotrophomonas*, *Flavobacterium* et *Cycloclasticus* (Chauhan et al., 2008; Juhasz et al., 2000; Samanta et al., 2002) ont également été identifiés. De multiples voies de dégradation ont été établies, indiquant la coexistence de systèmes enzymatique de types monooxygénases à cytochromes P-450 et dioxygénases intervenant dans la dihydroxylation initiale de ces molécules (Brezna et al., 2006; Juhasz & Naidu, 2000).

Le pyrène (4 cycles) a longtemps été utilisé comme composé modèle pour l'établissement des voies de dégradation des HAP "lourds", étant donné les similarités structurales avec des HAP reconnus comme cancérigènes (Peng et al., 2008). La

métabolisation du pyrène peut notamment donner lieu à la formation du 3,4-dihydroxyphénanthrène, dont la dégradation rejoint alors celle du phénanthrène *via* la voie du phtalate (Figure 7) (Kanaly & Harayama, 2010; Kim et al., 2007).

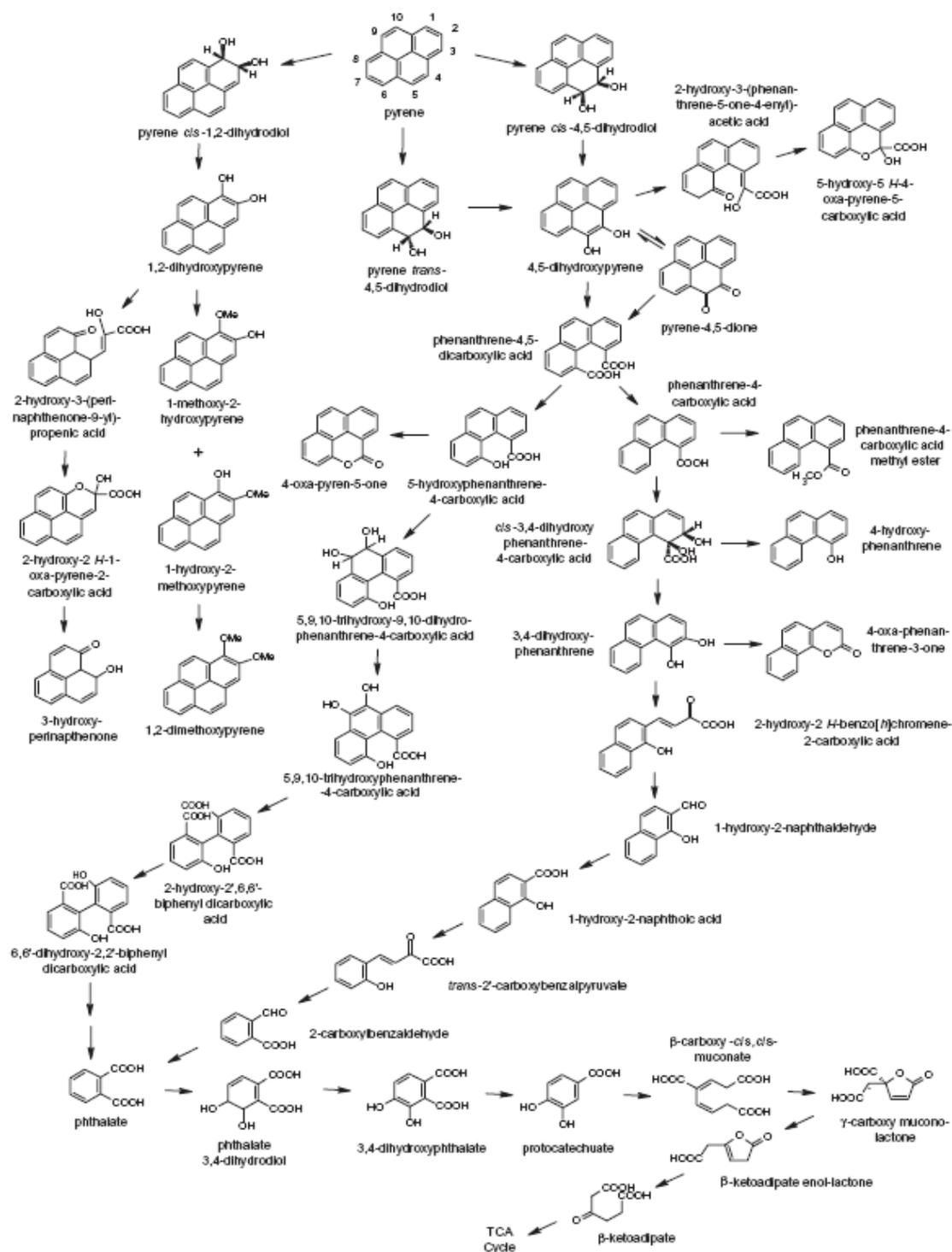


Figure 7 : Voies de biodégradations identifiées pour le pyrène; Kanaly & Harayama, 2010.

La connaissance des mécanismes moléculaires de biodégradation est primordiale afin de mieux comprendre dans quelles mesures les plantes peuvent impacter la rhizodégradation des HAP. La multiplicité des voies de dégradation selon les HAP considérés s'illustre également à travers la très grande variété des métabolites intermédiaires (Figure 7). L'existence d'analogues structuraux de ces métabolites dans la nature est susceptible de maintenir voir de favoriser localement la prévalence de certains phénotypes de dégradation (si ces molécules sont rapidement biodisponibles) (Haritash & Kaushik, 2009; Shaw et al., 2006; Singer et al., 2003).

#### ***1.2.2.1.3. Co-métabolisme, inhibition et dioxi***

Aucune souche bactérienne n'a encore été décrite pour sa capacité à croître sur un HAP dont le nombre de cycles est supérieur à 4, utilisé comme unique source de carbone et d'énergie (Kanaly & Harayama, 2010). Une des hypothèses serait que la forte rétention de ces HAP par la matière organique du sol, engendrerait des transferts de masse (et donc d'énergie) trop faibles pour assurer le métabolisme cellulaire basal. L'évolution de voies cataboliques n'aurait donc pas été favorisée par ces contraintes physico-chimiques (Johnsen et al., 2005). Ces composés récalcitrants ne servent donc pas de substrat de croissance à un seul type de microbe mais sont oxydés *via* une série d'étapes par un *consortium* de microorganismes : c'est une des caractéristiques du co-métabolisme (Bouchez et al., 1995; Perry, 1979). Le co-métabolisme *stricto sensu* se définit comme une réaction enzymatique non-spécifique, permettant la dégradation sans génération d'énergie ni utilisation de carbone par la cellule (Perry, 1979). En d'autres termes, il pourrait être considéré comme une sorte « d'investissement » qui se révèle cependant inefficace pour les bactéries, sans biodégradation assimilative du substrat initial. Il s'explique uniquement par la compétition du substrat dégradé, au niveau du site actif de l'enzyme, avec un substrat primaire structurellement similaire directement assimilable (Bouchez et al., 1995; Cunningham et al., 1993).

Plusieurs bactéries ont été isolées pour leurs capacités à co-métaboliser des HAP à 5 cycles et plus tels que le benzo(a)pyrène, le benzo(a)anthracène, le dibenzo(a)anthracène ou encore le coronène (Kalf et al., 1997; Kanaly & Harayama, 2010; Peng et al., 2008). Deux souches sont particulièrement étudiées pour l'établissement des voies de métabolisation du benzo(a)pyrène (B(a)P) : *Sphingobium yanoikuyae* B1; B8/36 (Gibson et al., 1975; Takeuchi et al., 2001) et *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (Heitkamp et al., 1988; Khan et al., 2002). Il est à préciser toutefois que la biodégradation des HAP à « haut poids moléculaire » s'effectue plus efficacement par un *consortium* de bactéries impliquées dans les différentes

étapes cataboliques que par des souches étudiées isolément (Bouchez et al., 1999; Kanaly et al., 2002; Lafortune et al., 2009; Vinas et al., 2005).

Les co-métabolites de biodégradation des HAP peuvent être constitués de mélanges d'autres hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques tels que des HAP à faibles poids moléculaires (Gaskin & Bentham, 2005; Kanaly et al., 1999; Kanaly & Watanabe, 2004; Keck et al., 1989; Zhong et al., 2007), ou des intermédiaires de dégradation des HAP, plus solubles, comme le salicylate (Chen & Aitken, 1998; Gaskin & Bentham, 2005; Powell et al., 2008; Rentz et al., 2008). La présence d'autres molécules organiques peut être également requise pour fournir l'énergie nécessaire au maintien de populations microbiennes dégradantes (sans nécessairement agir directement dans le co-métabolisme), parmi lesquelles l'on peut citer des intermédiaires du cycle de Krebs : succinate, fumarate, acétate (Brzostowicz et al., 2003) ou des sources de carbone plus complexes : mélange de peptone, d'extraits de bœuf et de glucose (Zhong et al., 2007), broyats et exsudats racinaires (Corgie et al., 2004; Joner et al., 2002; Miya et al., 2001; Rentz et al., 2005).

Des phénomènes de « compétition » entre HAP pour la fixation au niveau des sites actifs des dioxygénases peuvent aussi avoir lieu, conduisant à l'inhibition de la dégradation (Bouchez et al., 1995). Une inhibition de la biodégradation de HAP « lourds » (fluoranthène, pyrène) peut avoir lieu en présence de molécules plus légères (naphtalène, phénanthrène, fluorène) (Bouchez et al., 1999; Bouchez et al., 1995; Dean-Ross et al., 2002; Shuttleworth & Cerniglia, 1996) ou inversement (Zhong et al., 2010). La production de métabolites peut aussi conduire à la répression de la dégradation des molécules initiales dans le cas du benzo(a)pyrène ou du dibenzo(a,h)anthracène (Juhasz et al., 2002).

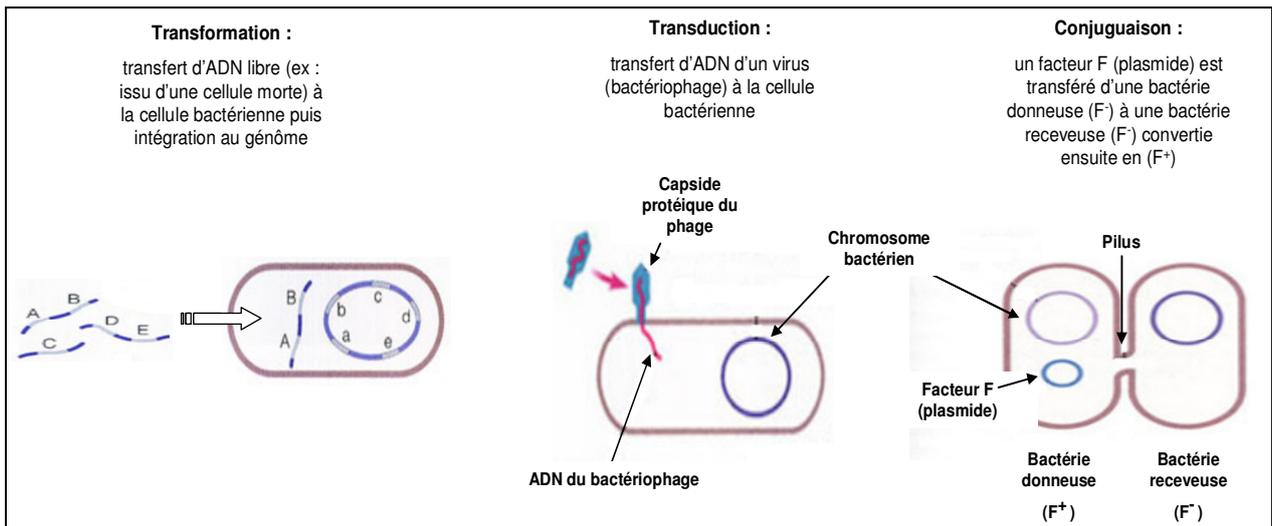
En définitive, les microorganismes peuvent co-métaboliser un nombre variable de composés carbonés biodisponibles, ou sélectivement orienter leur métabolisme vers la dégradation de composés organiques plus facilement assimilables (Rojo, 2010). Ce phénomène, parfois observé au cours des expériences de bioremédiation, est appelé « diauxie » et découle des processus de régulation de l'expression génique décrits ci-après (Bennett, 1995; Rojo, 2010). Il fait notamment référence au processus de diauxie (terme défini pour la première fois par Jacques Monod (1910-1976)) consistant à métaboliser séquentiellement deux sources de carbone l'une après l'autre, donnant lieu à deux phases de croissance observables.

## ***I.2.2.2. Régulations géniques***

### ***I.2.2.2.1. Adaptation des populations dégradantes***

La capacité des bactéries à s'adapter à la dégradation des xénobiotiques s'explique davantage par l'acquisition de gènes cataboliques que par des modifications géniques résultant de l'accumulation de mutations ponctuelles (Davison, 1999). L'acquisition de gènes fonctionnels repose sur des processus de transferts géniques horizontaux et des réarrangements de séquences d'ADN (Springael & Top, 2004). Les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la dégradation des HAP sont portés par les chromosomes, les plasmides, les transposons et autres éléments génétiques mobiles (« îlots génomiques »...) (Springael & Top, 2004; van der Meer et al., 1992) généralement arrangés en « clusters » regroupant : (i) les gènes du catabolisme codant les enzymes de dégradation, (ii) les gènes codant les systèmes de transport actif du substrat, et (iii) les gènes régulateurs de ces systèmes de dégradation et de transport (Díaz & Prieto, 2000).

Trois mécanismes de transfert horizontaux de gènes ont été identifiés chez les bactéries (Figure 8) : la transformation, impliquant directement l'incorporation de séquences d'ADN exogène au génome de la cellule ; la transduction, par laquelle l'ADN d'une cellule hôte est internalisé dans une capsid virale (bactériophage) agissant comme vecteur pour le transfert de l'ADN dans une cellule réceptrice ; et la conjugaison, mécanisme de transfert d'ADN plasmidique, sous l'étroite dépendance de contacts physiques et d'échanges entre bactéries donneuses et réceptrices (Davison, 1999). Ce dernier processus est présent chez la plupart des genres bactériens. Les plasmides sont ainsi les éléments génétiques mobiles les plus étudiés, suivis des transposons (Davison, 1999). Des méthodes d'isolement de nouveaux plasmides cataboliques encodant la dégradation du naphthalène ont, par exemple, été élaborées, à partir de l'introduction de souches bactériennes réceptrices dans des échantillons contaminés (Stuart-Keil et al., 1998).

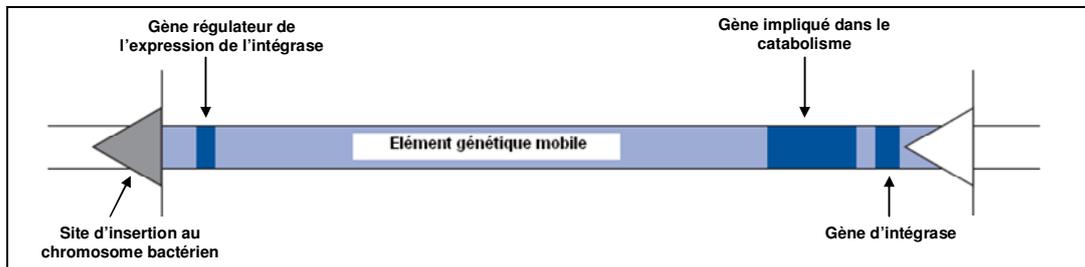


**Figure 8 : Mécanismes de transferts horizontaux de gènes chez les bactéries** (<http://bioinfo.uqam.ca/bif7002/archives/Hiver2005/Phylogenie/>, adapté).

La conjugaison constituerait le mode de transfert génique le plus courant dans les sols, en particulier dans la rhizosphère (Mølbak et al., 2007; Nojiri et al., 2004). La fréquence élevée du phénomène s'expliquerait par une activité bactérienne plus importante du fait de l'exsudation racinaire et par la formation de biofilms à la surface des tissus végétaux, constituant un support physique stable, favorable aux contacts cellulaires (Jussila et al., 2007; Smit et al., 1998; Van Elsas et al., 2003). La plupart des gènes de dégradation font parti d'opérons portés par des plasmides à large spectre d'hôtes, conjuguatifs, ou mobilisables suite à des réarrangements géniques, favorisant *in fine* la persistance de voies cataboliques des xénobiotiques au sein des communautés bactériennes (van der Meer et al., 1992). En effet, la présence de certains gènes au niveau d'éléments génétiques mobiles comme les transposons, permet des recombinaisons géniques entraînant la mobilisation de plasmides non conjuguatifs et leur co-intégration dans des éléments conjuguatifs (Springael & Top, 2004; Top & Springael, 2003). Par exemple, le cluster du gène *nah* codant pour la naphthalène dioxygénase et porté par le plasmide NAH7, est localisé sur des transposons très mobiles (Sota et al., 2006; Tsuda et al., 1999). Les voies enzymatiques de dégradation des xénobiotiques sont souvent portées par des plasmides de plus de 50 kbp (Davison, 1999).

Outre les éléments génétiques de type plasmides et transposons, un troisième groupe d'éléments mobiles favorisant l'adaptation des populations bactériennes, est constitué par les « îlots génomiques » ou « phage-like integrases » (Springael & Top, 2004). Ce terme a été proposé pour une grande variété de segments d'ADN mobiles (ou potentiellement mobiles) intégrés dans le chromosome bactérien ou autres réplicons (Springael & Top, 2004).

Typiquement, ils comportent un gène encodant une intégrase et un module génique similaire à ceux impliqués dans la conjugaison des plasmides (Figure 9).



**Figure 9 : Schéma constitutif d'un îlot génomique;** l'élément génétique mobile est excisé du chromosome par l'intégrase, se retrouvant sous forme d'ADN circulaire (plasmide) avant son transfert à une cellule bactérienne par conjugaison (d'après Springael & Top (2004)).

Certains « îlots génomiques » ont ainsi été montrés conjuguant. Par ailleurs, les récents travaux de séquençages et de comparaisons génomiques en écologie moléculaire ont montré que le rôle joué par ces différents éléments génétiques mobiles, repose à la fois sur la dissémination et sur la construction de « nouvelles » voies cataboliques (Springael & Top, 2004). Le premier phénomène conduit notamment à l'augmentation de la diversité des microorganismes compétents au sein des communautés bactériennes (Springael & Top, 2004). Le second résulterait de l'assemblage de gènes entiers ou de séquences partielles pré-existants dans une nouvelle cellule hôte, un processus communément appelé « rapiéçage métabolique » (Copley, 2000). Ainsi, une nouvelle voie métabolique pourrait apparaître suite à des modifications géniques secondaires telles que des mutations ou des réarrangements de séquence, donnant lieu à une plus grande affinité de l'enzyme pour le composé exogène, ou à des niveaux d'expression génique suffisamment importants chez la bactérie hôte (Copley, 2000). De récentes études, basées sur les analyses phylogénétiques des gènes de dégradation du naphthalène chez *Pseudomonas fluorescens* ou du phénanthrène chez *Burkholderia* et des gènes codant pour les ARN 16S (petites sous-unités des ARN ribosomiaux de 16 Svedberg dont les séquences génétiques sont conservées chez tous les procaryotes, permettant des comparaisons phylogénétiques), ont témoigné de l'existence de tels phénomènes de « construction de voies cataboliques » *in situ* (Herrick et al., 1997; Wilson et al., 2003). Cependant, les gènes introduits confèrent un avantage sélectif aux cellules réceptrices uniquement dans la mesure où ils sont exprimés (Davison, 1999).

#### ***1.2.2.2. Régulation du métabolisme cellulaire***

L'expression des gènes codant pour les enzymes de dégradation des composés aromatiques de type HAP est régulée au niveau intracellulaire. Les bactéries perçoivent en permanence de leur environnement une multitude de signaux physico-chimiques les renseignant sur la biodisponibilité de nouvelles sources de carbone et d'énergie. Elles doivent intégrer l'ensemble de ces signaux pour fournir rapidement la réponse métabolique la mieux adaptée au maintien du « fitness » cellulaire, *i.e.* la valeur sélective de la bactérie, lui permettant de rester compétitive, en particulier dans des environnements extrêmement spécifiques comme les « micro-niches » présentes dans les agrégats de sol (Cases & de Lorenzo, 2005; Díaz & Prieto, 2000). La régulation du catabolisme du substrat pris en charge par la bactérie, en l'occurrence les HAP, peut se faire directement *via* des mécanismes de rétroaction mettant en jeu des métabolites intermédiaires de la dégradation (Figure 8), ces mécanismes spécifiques étant eux-mêmes sous la dépendance d'une régulation « globale » du métabolisme cellulaire (Tropel & van der Meer, 2004).

Durant la régulation catabolique spécifique, la synthèse des enzymes de dégradation n'est activée que lorsque les substrats spécifiques sont présents dans l'environnement bactérien. La bactérie détecte généralement la présence du substrat à l'aide d'une protéine régulatrice. Cette protéine, en se fixant à la région promotrice de l'opéron catabolique spécifique, par exemple celui de la naphthalène dioxygénase, peut activer et stimuler davantage la transcription de voies de dégradation spécifiques et induire la répression de la transcription de voies constitutives (Figure 8).

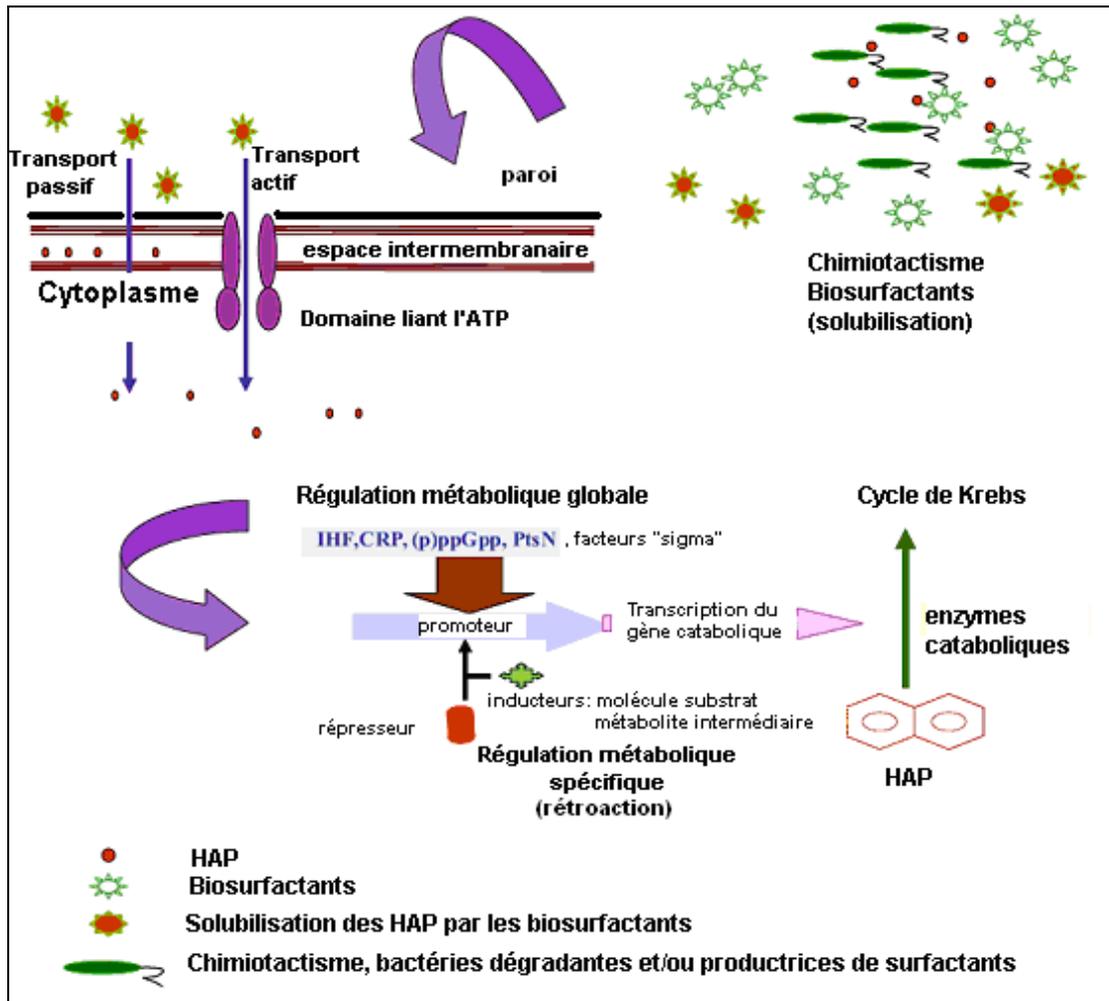


Figure 10 : Mécanismes majeurs de biodégradation des HAP, *adapté de Chauhan et al.(2008).*

Les différentes protéines régulatrices sont classées en fonction de leur degré d'homologie au niveau des séquences primaires. Les types de régulateurs les plus abondants sont ainsi les protéines de la famille « LysR », « XylS », « XylR », et « IclR » (Gerischer, 2002). Les phénomènes d'induction et de répression de l'expression génique sont des processus particulièrement importants pour les bactéries, leur permettant de s'adapter rapidement aux différentes sources de carbone biodisponibles sans perdre de leur compétitivité. Beaucoup d'intermédiaires des voies de métabolisation des HAP sont susceptibles d'agir en tant qu'inducteurs ou répresseurs de l'expression génique des enzymes de dégradation. Les protéines de régulation elles-mêmes peuvent faire l'objet de répressions cataboliques, d'activation par induction *via* les substrats dégradés, ou par régulation indirecte à travers d'autres voies métaboliques adjacentes (Díaz & Prieto, 2000; Tropel & van der Meer, 2004). Par conséquent, on peut supposer que des analogues structuraux d'origine naturelle pourraient produire des effets similaires (Bhandari et al., 1985). Certains composés

organiques, retrouvés en l'occurrence dans les exsudats racinaires et possédant des similarités structurales avec les polluants tout en étant plus solubles et biodisponibles, pourraient avoir un impact significatif au niveau du potentiel dégradant des communautés bactériennes dans les sols, en maintenant ainsi un phénotype de dégradation de par leur présence (Fletcher & Hegde, 1995; Krutz et al., 2005; Miya et al., 2000; Miya et al., 2001; Shaw et al., 2006; Singer et al., 2003).

Des mécanismes de régulation globale du métabolisme à l'échelle cellulaire se surimposent aux voies de régulation génique spécifiques des composés aromatiques. Ces niveaux supérieurs de régulation sont i) des mécanismes établissant une hiérarchie entre diverses voies métaboliques lors de la présence simultanée de différents substrats spécifiques, ii) des mécanismes engendrant la dégradation préférentielle de certaines sources de carbone en réprimant la transcription de gènes encodant des voies spécifiques, *i.e.* phénomène de répression catabolique du carbone (Stülke & Hillen, 1999), iii) des mécanismes impliquant une régulation médiée par des alarmones (répression de synthèse des ARNr) de type (p)ppGpp ou dépendant de la phase de croissance cellulaire (Gerischer, 2002) (10). Par exemple, en présence simultanée de benzoate et de *p*-hydroxybenzoate, les gènes encodant la dégradation du benzoate seront préférentiellement exprimés (Gaines et al., 1996). Dans de nombreux cas, la répression des gènes du catabolisme des composés aromatiques par d'autres sources de carbone préférentielle est observée (Rojo, 2010). Il peut s'agir par exemple d'acides organiques comme le succinate chez les bactéries des genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter* (Gerischer, 2002). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation diffèrent entre les genres bactériens, pouvant impliquer l'inhibition d'une protéine activatrice spécifique (Muller et al., 1996), la liaison de la source de carbone préférentielle à un régulateur protéique (McFall et al., 1997), ou l'action indirecte de différentes protéines régulatrices (PtsN, CRP, IHF) et facteurs de transcription (facteurs  $\delta$ ...) (Cases et al., 1999; Gerischer, 2002). La phase de croissance cellulaire, liée notamment à la nature du milieu de culture bactérien, peut aussi influencer sur la régulation globale par l'intermédiaire d'alarmones (Carmona et al., 2000). Une forte répression de l'expression des opérons cataboliques du plasmide TOL (dégradation du toluène) a pu être démontrée lors de croissance bactérienne en milieu riche Luria-Bertani ou en présence d'acides aminés (Duetz et al., 1996; Tover et al., 2001). L'état physiologique de la bactérie mais aussi des paramètres environnementaux comme la température et le pH sont finalement impliqués dans la régulation globale des différents opérons cataboliques (Figure 10) (Cases & de Lorenzo, 2005; Gerischer, 2002; Tropel & van der Meer, 2004).

### ***1.2.2.3. Biodégradation par les champignons***

Une grande variété de champignons (ascomycètes, basidiomycètes) lignolitiques et non-lignolitiques a été reportée pour leurs capacités à métaboliser les HAP de 2 à 6 cycles, parfois jusqu'à la minéralisation (Cajthaml et al., 2006; Cerniglia & C, 1997; Cerniglia et al., 1985). En général, les champignons filamenteux (*Aspergillus* sp., *Trichocladium canadense*, *Fusarium oxysporum*...) font partie des groupes les plus abondants dans les environnements pollués (Haritash & Kaushik, 2009). Différents complexes enzymatiques intracellulaires (cytochrome P-450) et extracellulaires (lignine peroxydases, manganèse peroxydase, laccases) sont impliqués dans la biodégradation des HAP (Cerniglia & C, 1997; Cerniglia et al., 1985; Peng et al., 2008). Toutefois, la croissance des champignons cultivés en milieu liquide nécessite obligatoirement la présence d'une source de carbone supplémentaire (Sutherland, 1992). L'intérêt des champignons en bioremédiation de polluants très hydrophobes comme les HAP réside en grande partie dans leurs enzymes lignolitiques extracellulaires. Ces dernières peuvent en effet diffuser jusqu'aux micropolluants non dissous et initier l'étape d'oxydation, les rendant par la suite hydrosolubles et accessibles aux bactéries dégradantes. Par ailleurs, les enzymes lignolitiques ne sont pas spécifiques, du fait de la diversité des motifs aromatiques polymérisés constituant la lignine, et peuvent oxyder une grande diversité de composés organiques (Gianfreda & Rao, 2004). La biodégradation des HAP dans les sols, en particulier celle des HAP « lourds », résulterait en réalité de clivages séquentiels des cycles aromatiques, initiés par les champignons et pris en charge ensuite par les cultures mixtes bactériennes (Boonchan et al., 2000; Kotterman et al., 1998; Meulenberg et al., 1997; Sack & Fritsche, 1997).

## **1.2.3. Phytoremédiation des sols pollués par les HAP**

### ***1.2.3.1. Définitions***

La phytoremédiation est une technique de bioremédiation *in situ* définie par l'utilisation de plantes potentiellement associées à des communautés de microorganismes (bactéries et champignons) pour dégrader, séquestrer ou stabiliser les contaminants présents dans le sol (Cunningham et al., 1993; Cunningham et al., 1996; Kuiper et al., 2004). Les nombreux travaux réalisés durant les deux dernières décennies ont témoigné de la capacité des plantes à remédier une grande variété de composés inorganiques et organiques. Différents

modes de phytoremédiation peuvent être distingués en fonction du type de polluant et des mécanismes d'action associés (Tableau 6).

**Tableau 6 : Mécanismes de phytoremédiation potentiels en fonction de la nature des contaminants;** (Kuiper et al., 2004; Marshall et al., 2007).

Mode d'action	Mécanisme	Contaminants
Phytoextraction	Absorption et concentration dans les tissus végétaux	Métaux, radionucléides, nanoparticules
Phytotransformation	Absorption et modification chimique dans les tissus végétaux	Solvants chlorés, explosifs
Phytostabilisation	Immobilisation dans la rhizosphère (zone directement impactée par les racines)	Métaux essentiellement
Phytovolatilisation	Absorption et évapotranspiration	Composés organiques volatiles (trichloréthylène, toluène, méthyl tert-butyl ether), certains métaux (Hg, Se)
Phytodegradation – <b>rhizoremédiation</b> ( <i>in/ex planta</i> , rhizodégradation)	Augmentation de la dégradation dans la rhizosphère	Hydrocarbures de pétrole dont HAP, explosifs, pesticides

Concernant les polluants organiques, les plantes favorisent la dissipation des HAP dans les sols *via* trois processus majeurs : l'immobilisation *ex planta*, l'absorption et/ou la dégradation par la plante, la stimulation de la biodégradation microbienne (rhizodégradation) (Alkorta & Garbisu, 2001; Ma et al., 2010 a; Pilon-Smits, 2005).

L'immobilisation des micropolluants est initiée par l'adsorption des HAP à la surface des particules organominérales du sol, les plantes contribuant à l'apport de matière organique et à la formation d'agrégats (Parrish et al., 2005). Il se forme progressivement une fraction non-extractible de HAP (Luthy et al., 1997; Parrish et al., 2005), à biodisponibilité et mobilité réduite dans l'environnement (Reid et al., 2000; Semple et al., 2003; White et al., 1997).

La dissipation de certains HAP peut aussi avoir lieu *via* l'absorption racinaire, suivie de la translocation et de la bioaccumulation dans les parties aériennes de la plante. Seule une fraction très réduite des HAP contenus dans les sols serait concernée par ces phénomènes (0,005 à 0,24% des HAP totaux du sol) (Fismes et al., 2002; Sun et al., 2010).

La mobilisation des HAP au niveau rhizosphérique peut être favorisée par l'exsudation racinaire d'acides organiques (par exemple acide citrique, acide oxalique) (Gao et al., 2010).

Par ailleurs, les contaminants lipophiles comme les HAP, peuvent s'adsorber fortement aux racines (Corgie et al., 2004; Schwab et al., 1998). Cet effet, plus prononcé avec l'âge de la plante, peut concourir à masquer la dissipation des HAP *in situ* (Schwab et al., 1998). En effet, la remobilisation des HAP peut conduire à une augmentation transitoire des teneurs en polluants au niveau rhizosphérique, rendant les interprétations « ambiguës » alors que les processus de dégradation microbienne sont pourtant actifs au niveau racinaire (Liste et al., 2000). En terme de biodégradation, les plantes possèdent également des enzymes capables de métaboliser certains HAP (dehalogenases, nitroreductases, peroxidases, laccases, et nitrilases) (Chroma et al., 2002; Gerhardt et al., 2009). Leurs temps de demi-vie dans les sols et sédiments, suggèrent qu'elles peuvent demeurer actives plusieurs jours après leur sécrétion racinaire ; elles peuvent alors être véhiculées dans la solution du sol et atteindre certaines molécules non accessibles aux microorganismes (Alkorta & Garbisu, 2001; Schnoor et al., 1995).

### ***1.2.3.2. Avantages de la phytoremédiation***

La phytoremédiation est une méthode de réhabilitation *in situ* des sols, non-invasive, basée sur l'exploitation des capacités naturelles de l'environnement à se restaurer lui-même (Gerhardt et al., 2009; Khan et al., 2004; Shimp et al., 1993). C'est une technique relativement simple à mettre en œuvre et particulièrement efficace lorsqu'elle est combinée à des techniques agronomiques appropriées (compostage, labourage) (Huang et al., 2004; Olson et al., 2008). De plus, l'alimentation du système se faisant *in fine via* l'énergie solaire (convertie naturellement en énergie chimique dans les chloroplastes), les coûts sont considérablement réduits (environ 8 à 40 €/tonne de sol traitée) (Erickson et al., 1995; McLntyre & Lewis, 1997; Pilon-Smits & Freeman, 2006). La phytoremédiation est de ce fait particulièrement adaptée à la réhabilitation de zones à contamination étendue (Schwitzguébel et al., 2002). Considérée comme la plus « esthétique » des techniques de réhabilitation, elle est généralement bien acceptée par le public, ce qui constitue une alternative de gestion attractive pour les industriels et administrateurs de sites contaminés (Cunningham et al., 1996; Gerhardt et al., 2009; Khan et al., 2004; Shimp et al., 1993).

Un des « bénéfices » indirect de la phytoremédiation est l'amélioration globale de la qualité du sol (apports en carbone organique, en oxygène, en divers nutriments) et de la structure du sol (augmentation des agrégats, de la porosité et de l'infiltration de l'eau) (Cunningham et al., 1996; Gerhardt et al., 2009). L'établissement d'un couvert végétal permet

également la stabilisation du sol, prévenant de l'érosion éolienne et de l'exposition directe des populations aux micropolluants (McLntyre & Lewis, 1997). De plus, des travaux relatifs à la phytoremédiation d'hydrocarbures grâce à *Vetiveria zizanioides*, ont indiqué que certaines espèces végétales adaptées à la croissance dans les sols pollués pouvaient favoriser à long terme la co-culture d'autres espèces non tolérantes (Cunningham et al., 1996).

### ***1.2.3.3. Limites de la phytoremédiation***

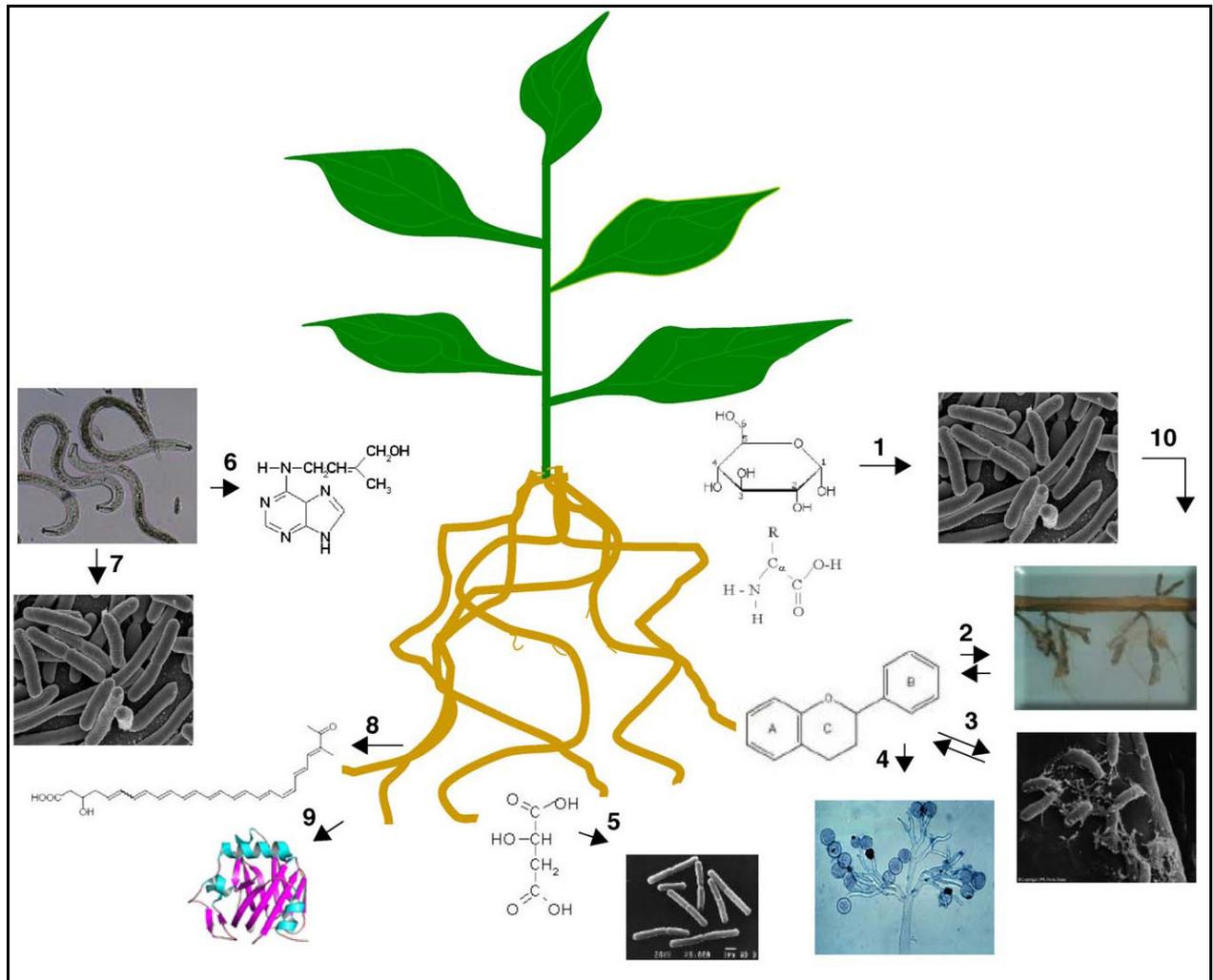
La phytoremédiation demeure une méthode de réhabilitation de plus longue durée que les techniques de traitement physico-chimiques : plusieurs saisons de culture sont habituellement requises pour la décontamination d'un site (McLntyre & Lewis, 1997). L'efficacité de la remédiation des polluants est aussi fonction de leur biodisponibilité vis-à-vis des plantes et microorganismes associés (Bennett, 1995; Cunningham et al., 1996; Strom, 1999). La contamination du sol à des profondeurs dépassant le mètre par des polluants hydrophobes (type hydrocarbures par exemple), diminue grandement les possibilités de rhizoremédiation car ceux-ci migrent difficilement vers les racines durant l'absorption racinaire (Bennett, 1995; Cunningham et al., 1996; Strom, 1999).

### ***1.2.3.4. Rhizoremédiation des HAP***

#### ***1.2.3.4.1. Aspects généraux***

La rhizoremédiation peut se définir comme la combinaison de la phytoremédiation assistée par la biostimulation bactérienne à proximité des racines (Kuiper et al., 2004). La rhizodégradation est un mode particulier de rhizoremédiation, résultant de la synergie entre plantes et microorganismes compétents (dégradants) à l'interface sol-racines pour stimuler et accélérer les processus naturels de biodégradation des polluants organiques (Aprill & Sims, 1990; Cunningham et al., 1993). Il s'agit du phénomène majeur de dissipation des HAP associé aux plantes (Gerhardt et al., 2009; Ma et al., 2010a). La rhizodégradation découle essentiellement de la stimulation des communautés microbiennes rhizosphériques à capacité de dégradation des HAP *via* la sécrétion de molécules directement assimilables contenues dans les exsudats racinaires (Gerhardt et al., 2009; Ma et al., 2010a; Sun et al., 2010). Ces molécules, sources de carbone et d'énergie, constituent un lien physique entre les plantes et les microorganismes du sol (Badri et al., 2009; Karlovsky et al., 2008). Elles sont responsables du développement et de la modulation de nombreuses interactions biotiques que certains assimilent parfois à un « dialogue souterrain » entre plantes et microorganismes

(Figure 11) (Badri et al., 2009; Bais et al., 2004; Harsh Pal et al., 2004; Karlovsky et al., 2008) conduisant à l'« effet rhizosphérique » (détailé dans le paragraphe suivant) qui favorise la rhizodégradation des HAP (Cunningham et al., 1996; Gerhardt et al., 2009; Olson et al., 2008; Ma et al., 2010a).



**Figure 11 : Interactions moléculaires entre plantes et organismes dans la rhizosphère, (Badri et al., 2009).** Les plantes sécrètent une grande variété de composés par l'intermédiaire de leurs racines; les sucres et les acides aminés sont notamment impliqués dans les phénomènes de chimiotactisme (1); les flavonoïdes agissent en tant que molécules signal dans l'initiation des interactions plantes-champignons mycorhiziens (2), rhizobium (3) et champignons pathogènes (oomycètes) (4); les acides aliphatiques (e.g. acide malique) sont impliqués dans le recrutement des bactéries promotrices de croissance végétale (PGPR, e.g. *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*...) (5); les nématodes sécrètent des régulateurs de croissance (cytokines) impliqués dans l'établissement de sites de nourrissage au niveau racinaire (6); et ils sécrètent également d'autres composés (acides organiques, acides aminés et sucres) impliqués dans le chimiotactisme des bactéries et les phénomènes de quorum sensing (7). Le rôle exact joué par d'autres composés de type acides gras (8) et protéines (9) sécrétés à la fois par les racines et par d'autres interactions tripartites (10) reste à déterminer.

#### ***1.2.3.4.2. L'effet rhizosphérique***

La rhizosphère est la région du sol qui s'étend généralement de 2 à 6 mm autour des racines : elle est sous l'influence directe du système racinaire du fait de rhizodépôts (dépôts de matière organique) (Hiltner, 1904). Quatre types de rhizodépôts sont induits par la présence des racines : i) les cellules desquamées de la coiffe racinaire, ii) les sécrétions de mucilage (mélange de polysaccharides et de protéines), iii) les exsudats racinaires (diffusion passive de solutés à faible poids moléculaire) et iv) les débris cellulaires épidermiques (dérivés de cellules sénescents) (Nguyen, 2003). L'ensemble de ces substances représente une source de carbone et d'énergie rapidement assimilable par les bactéries du sol. Les exsudats racinaires constituent toutefois l'apport de carbone majoritaire, pouvant représenter jusqu'à 40% des photosynthétats annuels de la plante (Jones et al., 2004; Nguyen, 2003). Ces substances, libérées par diffusion passive, sont composées de molécules organiques à faible poids moléculaire comme des sucres, des acides aminés, des acides carboxyliques et phénoliques, réparties le long d'un gradient de concentration entre le cytoplasme intact des cellules racinaires (concentrations de l'ordre du millimolaire) et le compartiment extérieur, *i.e.* solution du sol (concentrations de l'ordre du micromolaire) (Neumann & Römheld, 2000; Nguyen, 2003). A titre d'exemple, la diffusion basale des acides aminés ou d'acides organiques comme le malate a été estimée par calculs à environ  $0.3 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  de racine ou à  $120 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$  de racine fraîche de manière générale (Jones, 1998). Ces estimations ont pu être confirmées avec des résultats expérimentaux en conditions hydroponiques variant de 0,5 à  $0,9 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  de racine ( $100$  à  $380 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$  de racine fraîche) dans les 5 mm de la zone racinaire apicale chez le blé, la tomate, le pois chiche et le lupin blanc (Neumann et al., 1999).

L'exsudation engendre généralement un développement important des communautés bactériennes à proximité des racines avec une densité de microorganismes qui diminue en s'éloignant du rhizoplan (Corgié et al., 2003). Les exsudats racinaires favorisent l'augmentation de densité des bactéries du sol mais aussi la sélection des populations bactériennes et leur activité. Celle-ci est, en effet, 5 à 100 fois plus importante au niveau du sol rhizosphérique que du sol non impacté par les racines (Anderson et al., 1993; Erickson et al., 1995; Günther et al., 1996). Ces phénomènes sont caractéristiques de l'« effet rhizosphérique » et sont favorables à la biodégradation des polluants organiques (Cunningham et al., 1996; Erickson et al., 1995; Ma et al., 2010a).

#### ***I.2.3.4.3. Analyse de la diversité et de la densité bactérienne des sols***

Certains auteurs estiment que la diversité et la taille des populations microbiennes dans 2 m<sup>3</sup> de sol excèdent la diversité et la taille des populations des océans (Otten, 2008). Il est ainsi admis qu'un gramme de terre arable (non polluée) peut contenir de 1000 à 3000 espèces bactériennes différentes et jusqu'à 10<sup>12</sup> cellules au niveau des sols rhizosphériques (Torsvik et al., 1990). Afin de quantifier et d'appréhender l'évolution des populations bactériennes concomitante aux phénomènes d'exsudation racinaire (Badri et al., 2009; Corgie et al., 2004; Karlovsky et al., 2008; Marschner et al., 2002), de nombreux outils d'analyse biologique ont été développés durant ces trois dernières décennies. Ils peuvent être classés en deux catégories : les méthodes basées sur la culture des microorganismes et celles liés à l'analyse moléculaire des séquences géniques bactériennes.

#### **Méthodes culturelles**

Ces méthodes, parfois qualifiées de « conventionnelles », consistent en la culture en laboratoire des bactéries du sol en recourant à divers milieux de culture plus ou moins sélectifs. Les souches bactériennes ayant témoigné d'une croissance, peuvent, en outre être quantifiées. En effet, le nombre total de germes cultivables peut être déterminé, exprimé en CFU (« Colony Forming Unit »), *i.e.* unité formant colonie sur gélose solide, ou en NPP (nombre le plus probable), dont la technique a récemment été améliorée par la méthode des micro-gouttes (système MicroDrop<sup>®</sup>) (Bruns et al., 2003). Des dénombrements directs par comptage en microscopie photonique (éventuellement avec coloration) ou en cytométrie de flux (caractérisation d'une suspension cellulaire monodispersée entraînées par un flux liquide sous pression) sont aussi employés (Sakamoto et al., 2005). Les microorganismes cultivés peuvent être isolés, purifiés et identifiés *via* divers critères morphologiques, biochimiques et génétiques. De nombreux milieux de culture sélectifs ont été développés afin de différencier divers groupes bactériens aux capacités métaboliques variées. Par exemple, les géloses « S1 de Gould » permettent l'isolement spécifique des bactéries rhizosphériques du genre *Pseudomonas* en leur fournissant les nutriments spécifiques nécessaires à leur croissance (Gould et al., 1985). Dans le cadre des études de biodégradation des xénobiotiques, des milieux sélectifs sont aussi utilisés pour isoler, énumérer, purifier et identifier les bactéries capables de dégrader les contaminants. Dans ces milieux sélectifs, les contaminants étudiés sont intégrés au milieu de culture en tant que source unique de carbone ou d'azote. Les microorganismes capables de croître sont considérés comme ayant le potentiel de dégrader les polluants dans l'environnement. Afin d'isoler et d'énumérer les bactéries dégradant les HAP,

le phénanthrène ou le pyrène par exemple, retrouvés de manière ubiquistes dans les sites contaminés, sont très souvent ajoutés aux milieux de culture comme unique source de carbone (Euliss et al., 2008; Heitkamp et al., 1988). L'avantage des méthodes culturales réside dans la connexion directe entre certaines fonctions métaboliques et l'isolement des espèces bactériennes d'intérêt.

Cependant, la proportion des bactéries cultivables mises en évidence par ces techniques ne représenterait que 0,1 à 1% de la fraction totale des bactéries dans le sol, constituant un biais considérable dans l'interprétation de la diversité génétique réelle (Amann et al., 1995; Mayr et al., 1999; Otten, 2008; Torsvik et al., 1990). La toxicité des métabolites concentrés dans les milieux de culture, l'auxotrophie pour certains nutriments manquant, la dépendance stricte à des interactions mutualistes avec d'autres bactéries et la compétition entre bactéries opportunistes à taux de croissance élevé et celles à taux de croissance faible sont autant d'explications à l'incapacité de cultiver plus de 1% des espèces présentes (Manome et al., 2001). Afin de s'affranchir de ces limites, de nombreuses techniques moléculaires ont été développées durant les deux dernières décennies entraînant l'émergence de l'écologie microbienne moléculaire (Hirsch et al., 2010).

### **Méthodes moléculaires**

Les méthodes moléculaires permettent une étude plus approfondie des communautés microbiennes complexes, sans contrainte de culture ni d'isolement des souches. Elles fournissent des informations sur la diversité génétique globale des communautés bactériennes, ou métagénome, tout en permettant, théoriquement, la détection d'un gène ou d'une cellule cible parmi des milliers d'autres (Amann et al., 1995; Hirsch et al., 2010). Ces méthodes comprennent essentiellement celles liées (Hirsch et al., 2010) :

- aux technologies de la PCR : réalisation d'« empreintes génétiques » rendant compte de la diversité structurelle ou fonctionnelle, quantification de gènes par PCR quantitatives ou qPCR,
- au marquage moléculaire : « Stable Isotope Probing » (SIP, sonde à isotope stable) ou incorporation d'isotope radioactif (généralement  $C^{13}$ ) pour détection de populations ou communautés microbiennes actives par exemple,
- à l'hybridation moléculaire : utilisation de biopuces à ADN/ARN, « microarray », permettant d'analyser à la fois la diversité mais aussi le niveau d'expression des gènes dans un échantillon complexe à l'échelle des communautés de microorganismes

- au séquençage à haut débit (« pyrosequencing ») : séquençage de génomes environnementaux sans isolement préalable.

Les méthodes d'« empreintes génétiques », dites à résolutions « intermédiaires » permettent de mettre en évidence des variations génétiques à l'échelle des communautés voire des populations bactériennes dominantes. Les séquences d'ADN amplifiées peuvent être séparées sur la base de leur polymorphisme de séquence résultant en un polymorphisme de longueur des fragments de restriction avec la technique de la (T)-RFLP (« (Terminal) Restriction Fragment Length Polymorphism » ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux), de l'ARDRA (« Amplified rDNA Restriction Analysis » ou analyse des fragments de restriction des ADNr), de l'(A)RISA (« (Automated) Ribosomal Intergenic Transcribed Spacer Analysis » ou automatisation de l'analyse des séquences intergéniques transcrites de l'ADNr) (Napoli et al., 2008). L'utilisation de ces méthodes, en particulier la T-RFLP, peut être orientée vers le suivi d'une communauté voire d'une population en particulier. Des améliorations techniques peuvent être apportées pour augmenter leur sensibilité de détection avec, par exemple, le couplage de la T-RFLP à la dénaturation et séparation des fragments d'ADN par D-HPLC (« Denaturing-High Performance Liquid Chromatography »), suivi directement du séquençage (Barlaan et al., 2005; Penny et al., 2009). Des séquences géniques de tailles identiques peuvent aussi être séparées en fonction des variations nucléotidiques dans leur séquence : il s'agit de la technique de la DGGE (« Denaturing Gradient Gel Electrophoresis » ou gel d'électrophorèse en gradient (chimique) dénaturant), de la TTGE (« Temporal Temperature Gel Electrophoresis » ou gel d'électrophorèse en gradient de température), de la SSCP (« single-strand conformation polymorphism » ou polymorphisme de conformation des ADN simples brins) (Muyzer et al., 1993; Napoli et al., 2008). Ces dernières méthodes, basées sur la séparation par dénaturation des fragments d'ADN double brins, sont susceptibles d'être moins résolutive que les précédentes (T-RFLP, ARDRA et ARISA) tout en permettant la comparaison rapide de plusieurs communautés. Les techniques de DGGE-TTGE sont ainsi couramment utilisées pour l'étude des interactions plantes-bactéries au niveau rhizosphérique (Nannipieri et al., 2007; Singh et al., 2004). Leur capacité à mettre en évidence des variations structurales entre différentes communautés microbiennes est équivalente (Smalla et al., 2007). Elles ont l'avantage d'être parmi les moins coûteuses, tout en traitant un nombre important d'échantillons en peu de temps (Nannipieri et al., 2007; Napoli et al., 2008), motivant l'attention particulière portée à la TTGE dans le cadre du présent travail.

## DGGE-TTGE

### **Principe**

La DGGE et la TTGE permettent la séparation de petits fragments d'ADN (généralement inférieur à 400 pb) ayant la même taille mais des séquences nucléotidiques différentes. Ces deux techniques reposent sur les mêmes principes, seuls diffèrent les modes de séparation des fragments d'ADN, par application d'une dénaturation chimique (gradient d'urée et de formamide en DGGE) ou physique (gradient de température en TTGE) (Muyzer et al., 1993).

Dans le cadre de l'analyse de diversité des communautés bactériennes par TTGE, des amorces spécifiques peuvent être définies pour cibler l'amplification des régions variables des gènes codant pour la sous-unité des ADNr 16S ou 18S des ribosomes (Muyzer et al., 1993). La diversité fonctionnelle peut aussi être étudiée par cette technique en amplifiant d'autres gènes impliqués dans des fonctions métaboliques particulières, par exemple *nirS* lié aux processus de dénitrification (Hallin et al., 2006). La séparation des fragments amplifiés par PCR est basée sur la variabilité du contenu en bases azotées [G+C] des séquences géniques, conduisant à des propriétés de fusion différentes. Les ADN doubles brins amplifiés par PCR sont soumis à une migration électrophorétique avec un gradient de température (généralement compris entre 54 et 65°C pour la région V3 des ADNr bactériens de 16S). Les fragments d'ADN, aux températures de fusion différentes en fonction de leurs séquences, se dénaturent partiellement en diverses régions, ralentissant la migration des fragments à travers le gel. La diversité génétique peut finalement être calculée à partir du profil des bandes ayant été séparées (Muyzer et al., 1993).

### **Limites des techniques**

Théoriquement, les techniques de DGGE-TTGE permettent l'analyse de communautés bactériennes entières dans les échantillons de sols. En pratique, seules sont détectées les genres ou espèces dominantes. De fortes homologues de séquences entre deux espèces bactériennes proches peuvent conduire à la visualisation d'une seule bande sur le gel après électrophorèse, ou au contraire plusieurs bandes peuvent être générée à partir d'une même souche (Sekiguchi et al., 2002). Ces techniques sont aussi limitées par les biais inhérents à la PCR, parmi lesquels l'amplification préférentielle de séquences riche en [A+T], de faux positifs ou la diminution de sensibilité de l'amplification ; les biais dépendent eux-mêmes de la quantité et de la qualité des ADN extraits du sol (taille des molécules, extraction d'ADN de

bactéries préférentiellement lysées (Gram (-)), présence d'inhibiteurs de la PCR) (Thakuria et al., 2008; Wintzingerode et al., 1997).

De nombreuses méthodes d'extraction et de purification d'ADN de sol ont été publiées et commercialisées durant la dernière décennie, visant à améliorer la qualité des ADN extraits. Toutefois, aucune des procédures d'isolement d'ADN de sol n'est universellement applicable du fait de diverses limitations liées aux spécificités physico-chimiques de chaque type de sol (Rajendhran & Gunasekaran, 2008). Le but essentiel de ces méthodes consiste généralement à éviter toutes les substances interférentes comme les acides humiques et fulviques tout en permettant l'extraction d'ADN génomique peu fragmenté, *i.e.* de taille de plusieurs kilo-bases (kb), afin de garantir l'efficacité de l'amplification par PCR (Lakay et al., 2007; Young et al., 1993). En effet, les substances humiques peuvent se lier de manière covalente à l'ADN ou aux protéines et inhiber la PCR à des quantités de l'ordre de 10 ng (Tsai & Olson, 1992). De plus, dans les sols pollués, l'application des divers traitements de désagrégation des échantillons favorise à la fois la fragmentation des molécules d'ADN génomique et la libération d'autres contaminants de type polluants organiques (hydrocarbures et autres dérivés de matières organiques) et inorganiques (métaux, sels) (Desai & Madamwar, 2007; Fortin et al., 2004; Wintzingerode et al., 1997). Aussi, les protocoles d'isolement d'ADN développés pour les sols non pollués se révèlent souvent inefficaces pour les sols pollués, nécessitant une optimisation de chacune des étapes de purification (Desai & Madamwar, 2007).

Différents paramètres susceptibles d'impacter la qualité des ADN extraits, doivent être considérés durant l'établissement d'un protocole d'extraction d'ADN de sol (mode de lyse physique du sol et des bactéries, composition du tampon de lyse, pH...) (Burgmann et al., 2001; Miller et al., 1999; Nannipieri et al., 2006). Une combinaison de stratégies multiples est habituellement nécessaire pour assurer la purification finale des acides nucléiques extraits du sol. Parmi les dernières méthodes de purification innovantes, on peut citer l'adsorption des contaminants sur charbon actif (Desai & Madamwar, 2007), le pré-traitement du sol au sulfate d'aluminium (Persoh et al., 2008) ou l'élimination des acides humiques par flocculation au carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) ou chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) (Sagova-Mareckova et al., 2008). Cependant, l'efficacité relative de ces différentes stratégies dépend étroitement du type de sol. Récemment, Dunbar et ses collaborateurs (2007) ont également montré que l'utilisation du pyridoxamine (vitamine B6) ou de la thiamine (vitamine B1) pouvait sélectivement précipiter des acides humiques en solution aqueuses (Dunbar et al., 2007), la pyridoxamine étant, à cette fin, plus efficace que la thiamine. Toutefois, pour les extraits d'ADN purifiés grâce au pyridoxamine, l'intensité des bandes de produits PCR

visualisées sur gel d'agarose est souvent faible, suggérant des interactions entre des traces persistantes de pyridoxamine dans les extraits d'ADN purifiés et la Taq polymérase (Dunbar et al., 2007). Etant donné le mécanisme d'action et la réactivité de la pyridoxamine dans l'inhibition de la formation des produits avancés de la glycation (liaison covalente avec certains groupements carbonyles) (Khalifah et al., 1999), on pourrait supposer une fixation similaire avec certains groupements carbonyles de la Taq. En considérant les mécanismes de précipitation des acides humiques résultant de leurs interactions moléculaires avec le pyridoxamine, on pourrait supposer utiliser un analogue de cette vitamine qui puisse aussi favoriser l'élimination des contaminants de l'ADN sans toutefois inhiber les réactions de PCR ultérieures. Cette hypothèse a été vérifiée dans ce travail.

### **Application des techniques moléculaires à l'étude des communautés bactériennes rhizosphériques**

L'utilisation des techniques d'empreintes génétiques a révélé le fait que différentes plantes sont liées à différentes communautés de bactéries (Marschner et al., 2002), de champignons (Gomes et al., 2003) et d'archées (Nicol et al., 2003). Les effets de l'architecture racinaire, de l'âge de la plante et d'autres perturbations sur les communautés microbiennes ont aussi pu être mis en évidence par les techniques de D/TTGE et TRFLP (Kuske et al., 2002; Marschner et al., 2002; Nicol et al., 2003). La rhizosphère présente, par exemple, une plus grande diversité de gènes impliqués dans des fonctions clés du cycle de l'azote (gènes *amoA* et *nifH*) (Briones et al., 2003). Ces résultats ont permis de vérifier qu'à travers les phénomènes de rhizodéposition, les plantes sélectionnent davantage des groupes fonctionnels que des groupes taxonomiques de microorganismes.

Outre l'analyse de la diversité génétique, la mise au point de la PCR quantitative (« real time PCR ») dès le début des années 90 (Holland et al., 1991), a permis le développement de la quantification des gènes, aussi bien structuraux, *e.g.* ADN<sub>r</sub> 16S (Bach et al., 2002; Cébron et al., 2008), que fonctionnels, codant pour diverses fonctions biochimiques, *e.g.* oxydation de l'ammonium (Leininger et al., 2006), des HAP (Cébron et al., 2008) et autres (Nannipieri et al., 2006). La quantification est rendue possible par l'analyse en temps réel de l'amplification génique en phase logarithmique *via* l'utilisation de sondes fluorescentes (SYBR® Green) (Santhosh et al., 2007) ou d'intercalant d'ADN (TaqMan) (Bond et al., 2002).

Plusieurs techniques ont également été développées pour permettre la corrélation des fonctions ou activités métaboliques spécifiques à des identifications phylogénétiques de

microorganismes, parmi lesquelles l'hybridation *in situ* fluorescente (« Fluorescent In Situ Hybridisation », FISH), la technologie des microarrays et celle des SIP (Hirsch et al., 2010; Singh et al., 2004). La FISH permet notamment l'affiliation phylogénétique de bactéries non-cultivables *via* l'utilisation de sondes moléculaires fluorescentes ciblant les biomolécules (ADN, ARN, protéines). La combinaison de la technique FISH à celle de la microautoradiographie, reliant l'absorption d'un radioisotope par des bactéries au niveau individuel, pourrait permettre l'association de la détection et de la quantification des populations bactériennes actives dans la rhizosphère utilisant des substrats d'origine végétale (Singh et al., 2004). Cependant, l'immense diversité des microorganismes dans le sol et la quantité de sondes d'hybridation que cela recouvrerait, constitue une limite majeure à l'application d'une telle technique. Cette difficulté peut être résolue par la combinaison des techniques de radiographie à celle des biopuces. Comparée aux hybridations classiques des acides nucléiques sur membranes poreuses, l'hybridation sur lame de verre des biopuces offre les avantages d'une plus grande densité de sondes, d'une plus grande sensibilité, rapidité dans la détection (temps-réel), à moindre coût à plus long terme avec l'automatisation et la généralisation des systèmes (Zhou & Thompson, 2002). Des biopuces ont été développées pour l'analyse phylogénétique des communautés bactériennes (Cho & Tiedje, 2001), le suivi du statut métabolique et fonctions physiologiques associées (gènes fonctionnels et niveau d'expression) (Wu et al., 2001) et l'identification de populations cibles au sein d'une communauté, basée sur l'analyse de l'ensemble du génome (Salama et al., 2000).

Les méthodes les plus prometteuses dans l'identification des bactéries utilisant les exsudats racinaires, et dans l'estimation du niveau d'expression génique résultant, reposent probablement sur la combinaison des SIP à celle des biopuces et de séquençage à grande échelle (« pyrosequencing ») (Chen et al., 2008; Singh et al., 2004). Concernant la quantité extraite, lorsque l'échantillon de départ (microéchantillons racinaires, agrégats de sol) ou le nombre de copies d'ADN présentes est de taille très limitée, la quantité d'ADN peut être augmentée « post-extraction » par amplification de l'ensemble du génome (Gonzalez et al., 2005). L'efficacité d'amplification par une méthode en particulier, « Multiple Displacement Amplification » (MDA), en utilisant la polymérase à haute processivité  $\phi 29$  (provient du bactériophage  $\phi 29$  de *Bacillus subtilis* générant moins d'erreur et de plus grands fragments, *i.e.* 10 kb, au cours de la réplication d'ADN) a pu être démontrée à partir d'ADN extraits de sol, permettant des amplifications subséquentes par PCR, l'hybridation aux biopuces et le clonage du métagénome grâce aux dernières techniques de construction de banques

génomiques (« bacterial artificial chromosome » (BAC) ou chromosome bactérien artificiel pouvant aller jusqu'à 100 kb) (Chen et al., 2008; Gonzalez et al., 2005; Singh et al., 2004).

### **Perspectives de l'utilisation conjointe des méthodes moléculaires et culturelles**

Certaines limites conceptuelles persistent à l'utilisation des techniques moléculaires uniquement. Par exemple, ces approches ne rendent pas compte des innovations uniques dans le fonctionnement cellulaire qui ont pu gouverner l'évolution d'un groupe bactérien en particulier. De plus, les techniques d'analyses du métagénome, seules ou en combinaison avec l'expression de vecteurs, ne peuvent fournir suffisamment d'information concernant les activités biochimiques cruciales de tels organismes dans l'environnement (Cottrell et al., 2005; Rappé & Giovannoni, 2003). Le recours aux techniques d'amplification (PCR, polymérase  $\phi 29$ ) peut également entraîner un certain nombre de biais (amplifications préférentielles, erreurs de réplication...) (Hirsch et al., 2010).

Le développement de nouvelles méthodes culturelles (amendements en nutriments spécifiques tels que des molécules de signalisation, *i.e.* AMP, acyl-homosérinelactone, facteurs de croissance cellulaires, métabolites de dégradation) est également crucial dans la compréhension du rôle joué par certaines bactéries dans l'environnement (Ben-Dov et al., 2009; Giovannoni et al., 2007; Mukamolova et al., 1998).

Admettant que les méthodes d'analyse culturelles et moléculaires ont toutes deux leurs biais et leurs limites conceptuelles, la combinaison des deux approches et la quantité considérable de données recueillies a permis une exploration plus exhaustive de la diversité bactérienne (Ben-Dov et al., 2009; Cheng & Foght, 2007; Giovannoni et al., 2007).

Dans le cadre de cette étude, les relations exsudats-bactéries, directement impliquées dans les phénomènes de dégradation des HAP par co-métabolisme, seront d'abord appréhendées au niveau d'organisation le plus simple, par culture *in vitro*. L'analyse *in situ* de la biostimulation et de la diversité des communautés bactériennes, sélectionnées par l'environnement rhizosphérique de *Miscanthus x giganteus* et résultant d'interactions complexes plantes-bactéries-sol, nécessitera le couplage de méthodes culturelles à celles de biologie moléculaire (PCR-TTGE).

### ***I.2.3.5. Biostimulation de la dégradation des HAP***

#### ***I.2.3.5.1. Généralités***

Dans le cadre particulier de la rhizodégradation des polluants organiques, la caractérisation des relations mutualistes ou fortuites entre plantes et bactéries a orienté certains travaux vers la mise en place de systèmes de remédiation « métabolomiques<sup>3</sup> ». De tels systèmes visent à favoriser la dégradation de polluants organiques (HAP, organochlorés...) en promouvant sélectivement certaines interactions métaboliques (co-métabolisme) entre plantes et microorganismes (Karlovsky et al., 2008; Savka & Farrand, 1997). Outre la compréhension des mécanismes moléculaires de biodégradation bactérienne, l'effort doit également être porté sur le choix de plantes adaptées à la croissance en sols pollués et établissant des conditions favorables à la dissipation des polluants.

Le nombre d'études consacrées à la phytoremédiation des HAP ces dernières décennies représente une quantité importante de données qu'il est désormais possible d'intégrer dans des méta-analyses. Ces types d'analyses combinent un ensemble de méthodes statistiques permettant, au sens étymologique du terme, une « analyse des analyses » (Ainsworth et al., 2007). Un des intérêts majeurs des méta-analyses réside dans la capacité à quantifier objectivement l'amplitude globale des réponses du phénomène; cela grâce à des outils statistiques en dépit des variabilités inhérentes à la multiplicité des études prises en comptes (Ainsworth et al., 2007). Adaptée depuis peu au domaine de l'écologie, les seuls travaux relatifs à la phytoremédiation des HAP à notre connaissance, sont ceux de Ma et ses collaborateurs (Ma et al., 2010a, b). A partir de la méta-analyse d'un répertoire de données impliquant 51 espèces de plantes (et une étude portant sur des exsudats synthétiques), soit plus de 668 comparaisons différentes, trois résultats majeurs ont pu être démontrés de manière statistiquement significative, toutes variations confondues (espèces de plantes, type de sol, de contamination, etc) (Ma et al., 2010a) :

- la présence des plantes favorise la dissipation des HAP dans les sols, même pour ceux à haut poids moléculaire (4 cycles et plus),

---

<sup>3</sup> Méthode d'exploration très générale des organismes vivants qui décrit de façon exhaustive les différents métabolites présents dans les fluides biologiques ou dans les tissus. Elle permet de comprendre l'impact des perturbations étudiées tant sur le plan génétique qu'environnemental. Dans le contexte de phytoremédiation, il s'agit ici d'identifier les métabolites de dégradation des polluants d'une part et les rhizodépôts d'autre part témoignant de similarités structurales avec les premiers, pouvant donner suite à des phénomènes de dégradation par co-métabolisme (Narasimhan et al., 2003; Savka & Farrand, 1997).

- la rhizosphère favorise la croissance des microorganismes à capacité de dégradation des HAP par rapport au sol non rhizosphérique,
- la contamination en HAP a une influence négative sur la croissance des plantes, essentiellement au niveau des parties souterraines.

La synthèse « méta-analytique » de ces données a par ailleurs révélé que les familles les plus efficaces quant à la dissipation des HAP étaient celles des Alliées et des Chénopodiacées suivies des Poacées et Fabacées (Ma et al., 2010a). Selon les auteurs, la prédominance des plantes aromatiques dans les études de phytoremédiation pourrait expliquer l'augmentation des capacités des microorganismes à dégrader les HAP *via* l'exsudation dans la rhizosphère de composés aromatiques (Ma et al., 2010a). Certains de ces composés, de part leur analogie structurale avec les polluants organiques, seraient susceptibles de favoriser l'induction d'enzymes de dégradation par co-métabolisme exsudats-HAP.

Dans le cas des graminées (Poacées) et des légumineuses (Fabacées), souvent citées pour leur potentiel à favoriser la dissipation des HAP (Aprill & Sims, 1990; Günther et al., 1996; Olson et al., 2008; Qiu et al., 1997; Reilley et al., 1996), les raisons en sont multiples. Les graminées possèdent un système racinaire fasciculaire offrant les rapports surface/volume les plus élevés par volume de sol tout en assurant une pénétration en profondeur parfois supérieure à un mètre (Aprill & Sims, 1990). La phytoremédiation est favorisée par la production de biomasse racinaire et le « turn-over » élevé des racines et racelles (Leigh et al., 2002; Miya et al., 2001). De plus, les graminées renferment une diversité génétique leur conférant un fort potentiel d'adaptation et de croissance dans les sols pollués aux hydrocarbures (Aprill & Sims, 1990). La biodégradation des contaminants organiques par les microorganismes s'accompagne notamment d'une consommation accrue en divers nutriments (azote, phosphore...) accentuant les phénomènes de compétition entre plantes et microorganismes (Sun et al., 2010). Les légumineuses, de par leur autonomie d'approvisionnement en azote, sont moins susceptibles d'être en compétition avec les microorganismes décomposeurs, ce qui expliquerait en partie leur « efficacité » à s'implanter dans des sols dégradés et à remédier les polluants (Dzantor et al., 2000; Gudim & Syrratt, 1975; Ma et al., 2010a). Ces divers aspects écologiques ont orienté plusieurs travaux de rhizoremédiation vers l'utilisation conjointe de bactéries promouvant la croissance des plantes (PGPR pour « Plant Growth Promoting Rhizobacteria ») (Gurska et al., 2009; Huang et al., 2004), de champignons mycorhiziens (Khan, 2006) ou de microorganismes et plantes génétiquement modifiés afin de garantir la croissance végétale et l'augmentation des

phénomènes d'exsudation liés à la biomasse racinaire (Pilon-Smits, 2005; Pilon-Smits & Freeman, 2006).

#### ***1.2.3.5.2. Rhizodégradation des HAP***

L'environnement rhizosphérique est propice aux transferts de gènes cataboliques au sein des communautés bactériennes (van Elsas & Bailey, 2002; Van Elsas et al., 2003). Il peut en résulter une augmentation du potentiel de dégradation des communautés (Jussila et al., 2007; van Elsas & Bailey, 2002). Certaines espèces comme le pois (*Pisum sativum*) peuvent augmenter d'un facteur 10 les taux de transfert horizontaux de gènes au sein de leur rhizosphère en comparaison à d'autres espèces comme l'orge (*Hordeum vulgare*) (Mølbak et al., 2007). De même, certains acides organiques (citrate, succinate, lactate, acetate), acides aminés (alanine, glycine) et sucre (glucose) contenus dans les exsudats peuvent stimuler les phénomènes de transformations bactériennes (Nielsen & van Elsas, 2001). Lorsque la plante exsude un composé particulier en réponse à la présence d'un contaminant, on parle d'interactions « spécifiques », et dans le cas d'exsudation d'un composé structuralement similaire au xénobiotique sans réponse à un contaminant, d'interaction « non spécifique » (Germida et al., 2002).

Ces interactions plantes-microorganismes augmentent l'activité bactérienne et la prévalence des gènes et/ou souches impliquées dans la dégradation du contaminant. Si le composé exsudé est suffisamment similaire au xénobiotique (contaminant), il peut y avoir dégradation de ce dernier par co-métabolisme, grâce au manque de spécificité de l'enzyme de dégradation (Germida et al., 2002; Singer et al., 2003). La prolifération « fortuite » des populations de bactéries dégradantes du fait de l'exsudation de composés facilement assimilables est souvent reportée, favorisant *in fine* une meilleure dissipation des hydrocarbures (Da Silva et al., 2006; Kamath et al., 2004; Rentz et al., 2005). La fraction des exsudats racinaires comprenant les acides organiques et les acides aminés (environ 2% du carbone organique total (COT) des exsudats (Dakora & Phillips, 2002; Farrar & Jones, 2000), ainsi que les acides phénoliques (0,02% COT) (Grayston et al., 1997; Phillips, 2008), regroupe les composés identifiés à ce jour pour leurs effets stimulant ou inhibiteur de l'expression des gènes impliqués dans la dégradation des HAP (Tableau 7). Ces composés peuvent agir à tous les niveaux des voies métaboliques avec différents effets (induction ou inhibition de l'expression génique) en fonction des souches considérées. Leur action peut toutefois être modérée par l'état physiologique global de la bactérie (I.2.2.2.; Figure 10).

Par ailleurs, les effets contradictoires parfois observés entre des essais utilisant des mélanges d'exsudats reconstitués « *in vitro* » et des essais « *in vivo* », pourraient s'expliquer par l'absence de composés inducteurs ou inhibiteurs présents dans les exsudats et non encore identifiés. En effet, si de nombreuses études ont été menées pour mettre en évidence le rôle régulateur de molécules à interactions non spécifiques comme les acides organiques et acides aminés, très peu ont pu établir un lien direct avec la présence, dans les exsudats, de composés aromatiques naturels structuralement similaires aux HAP et leur rôle inducteur dans l'expression des gènes de dégradation. Les composés de type flavonoïdes et coumarines constituent un groupe de composés aromatiques majoritaire parmi les métabolites secondaires exsudés (Shaw et al., 2006; Singer et al., 2003). Ils interviennent, par exemple, dans la colonisation racinaire des bactéries et des mycorhizes, dans les processus de défenses de la plante face aux agents pathogènes, et dans certains phénomènes d'allélopathie (Bertin et al., 2003; Shaw et al., 2006). L'évolution conjointe des plantes et herbivores serait l'un des moteurs de l'adaptation des microorganismes à la biodégradation de ces types de composés et, de manière fortuite, au métabolisme de beaucoup de molécules d'origine anthropique bien que l'émission de ces dernières dans l'environnement soit « récente » (Figure 12) (Crowley et al., 2000; Pineda et al., 2010; Singer et al., 2004).

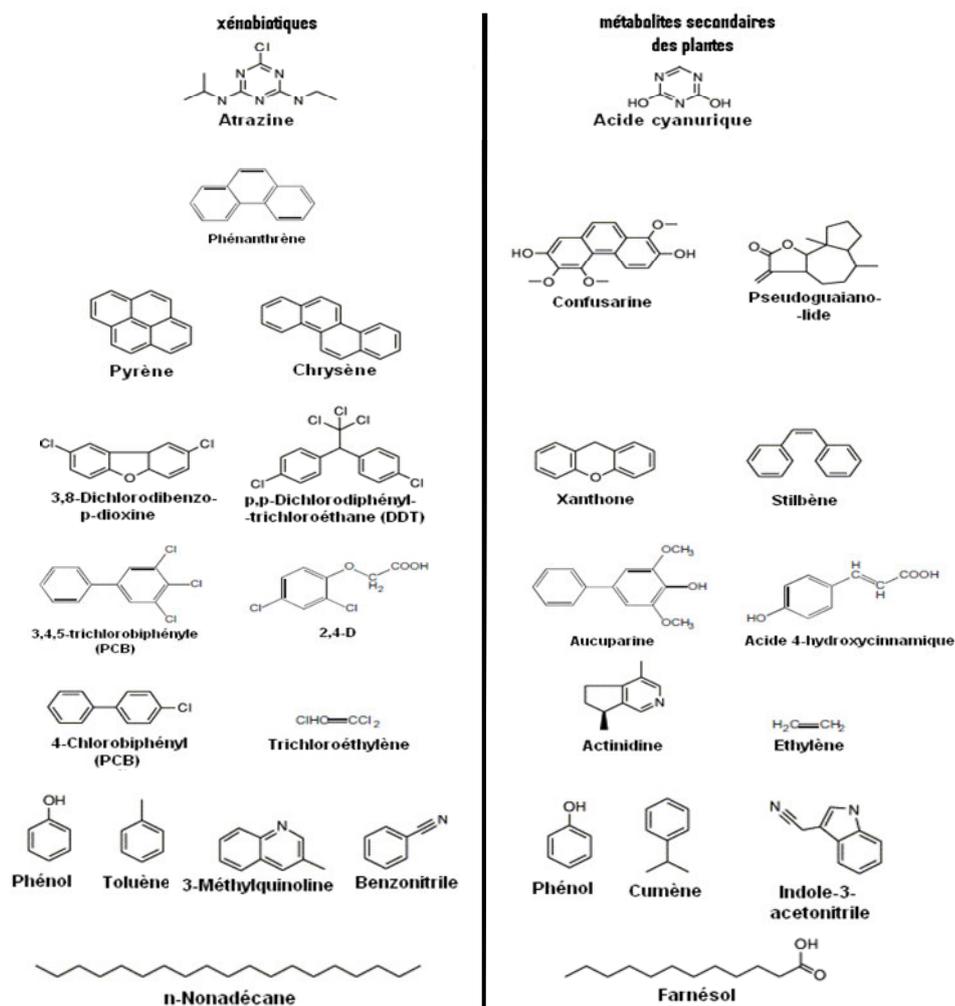


Figure 12 : Xénobiotiques structurellement analogues aux métabolites secondaires des plantes, (adapté de Shaw et al., 2006; Singer et al., 2003).

Cependant, depuis les premiers travaux faisant état des effets bénéfiques de la rhizoremédiation (Aprill & Sims, 1990), très peu de molécules dans les exsudats ont pu être clairement identifiées comme promotrices de la biodégradation (Yi & Crowley, 2007). Yi et Crowley (2007) ont montré l'effet promoteur du linnoléate contenu dans les tissus racinaires du céleri (*Apium graveolens*) sur la dégradation du pyrène par biostimulation de bactéries Gram (+) (Yi & Crowley, 2007). Des tests réalisés avec la morine comme flavonoïde ont montré, au contraire, l'inhibition de la dégradation des HAP (Qiu et al., 2004). Par ailleurs, aucun effet n'a pu être clairement démontré avec l'ajout de salicylate ou de terpènes à l'état pur dans les sols (Yi & Crowley, 2007). Ces résultats suggèrent davantage que les effets potentiellement inducteurs de molécules cycliques comme l'acide salicylique, certains flavonoïdes et terpènes, dépendraient de la présence d'autres composés favorisant la biodisponibilité des HAP, comme l'acide linoléique, ou nécessaire d'un point de vue bioénergétique (Erickson et al., 1995; Yi & Crowley, 2007).

Classe	Composés	Effets	Références
Sucres	glucose	Répression de l'expression des gènes du catabolisme (régulation globale)	(Stülke & Hillen, 1999)
Acides organiques	succinate*, citrate*, fumarate*	Répression de gènes du catabolisme des composés aromatiques	(Díaz & Prieto, 2000)
	Succinate*	Induction significative de la naphthalène dioxygénase chez <i>P. putida PCL1444</i>	(Kuiper et al., 2002)
	succinate*, citrate*, acétate*	Induction significative de la p-hydroxybenzoate hydroxylase chez <i>Acinetobacter ADP1</i> (voie du phtalate)	(Brzostowicz et al., 2003)
	Succinate*	Diminution de l'expression de la protocatéchol 3,4 dioxygénase chez <i>Pseudomonas spp.</i> (métabolisation du protocatéchol en $\beta$ -carboxy-cis,cis-muconate)	(Diab et al., 2006)
	Fumarate*	Inhibition dose-dépendante de ClcR (activateur de transcription dans la voie de métabolisation de composé chloro-aromatique) mais sans effet sur CatR (activateur de transcription dans la voie de dégradation du catechol)	(McFall et al., 1998)
	Acétate	Réduction de 40% de l'expression de nahG chez <i>Pseudomonas putida ATCC 17484</i>	(Kamath et al., 2004)
	glutamate	Inhibition de la dégradation du phénanthrène (sans relation dose-dépendante) chez <i>Pseudomonas putida ATCC 17484</i>	(Rentz et al., 2004)
	Malonate, fumarate*	Diminution de la prévalence des gènes de la catéchol 2,3 dioxygénase et de la naphthalène dioxygénase (hypothèse de diminution des transferts horizontaux de gènes); Diminution de la minéralisation du naphthalène et du phénanthrène	(Phillips, 2008)
Acides aminés	Acide linoléique	Biostimulation de populations bactériennes (Gram +) dégradantes du pyrène	(Yi & Crowley, 2007)
	Mélange complexe	Inhibition de la transcription d'un opéron catabolique du phénol chez <i>Pseudomonas putida</i>	(Putrins et al., 2007)
	Alanine et acétate	Stimulation des transfert horizontaux de gènes de la catéchol 2,3 dioxygénase et de la naphthalène dioxygénase	(Phillips, 2008)
Acides phénoliques	Alanine et succinate	Augmentation de la minéralisation du phénanthrène et du naphthalène	(Phillips, 2008)
	Acide phtalique	Augmentation de la minéralisation du phénanthrène	(Phillips, 2008)
	Salicylate	Induction de l'expression du gène nahG (transcription de la naphthalène dioxygénase)	(Chen & Aitken, 1998)
		Augmentation <i>in vitro</i> de la dégradation du phénanthrène, fluoranthène, pyrène, chrysène, benzo(a)pyrène, et benzo(a)anthracène mais inhibition <i>in vivo</i> (dans le sol)	(Kamath et al., 2004) (Yi & Crowley, 2007)
	Racines et extraits racinaires de <i>Morus spp.</i> (mûrier)	Dissipation rhizosphérique des HAP	(Olson et al., 2001; Olson & Fletcher, 1999)
Minéralisation du phénanthrène (augmentation non spécifique des bactéries dégradant les HAP)/répression de la minéralisation des HAP		(Da Silva et al., 2006; Kamath et al., 2004; Mueller & Shann, 2006)	

\*intermédiaires du cycle de Krebs

**Tableau 7 : Effets des différentes classes de composés organiques des sécrétions racinaires sur l'expression génique et la biodégradation des HAP.**

### ***I.2.3.5.3. Influence des facteurs environnementaux sur la rhizodégradation***

La structure et la taille des communautés microbiennes dans la rhizosphère varie essentiellement en fonction des caractéristiques physico-chimiques du sol (dont la présence de xénobiotiques), de la plante (espèce, cultivar) et de son stade de développement (Belz & Hurle, 2004; Berg & Smalla, 2009; Fierer & Jackson, 2006; Hawkes et al., 2007; Karlovsky et al., 2008; Mukerji et al., 2006; Nannipieri et al., 2007). Les processus de biodégradation sont des phénomènes complexes résultant des interactions entre ces différentes composantes qui influencent directement la biodisponibilité des HAP, l'activité des microorganismes, et, dans le contexte particulier de la phytoremédiation, l'exsudation racinaire. L'impact de l'ensemble de ces facteurs environnementaux (résumé ci-après) entraîne finalement la dissipation progressive d'une fraction du mélange initial de polluants, la fraction restante regroupant les composés les plus récalcitrants à la dégradation (Alexander, 2000).

#### **Texture du sol et teneur en matières organiques**

La texture du sol peut affecter les processus de phytoremédiation en influençant la biodisponibilité des contaminants. Les sols argileux ont une surface d'adsorption aux HAP plus importante que les sols limoneux ou sableux, pouvant entraîner une biodisponibilité et une minéralisation moindre des contaminants (Carmichael & Pfaender, 1997). De plus, la plupart des HAP migrent progressivement à l'intérieur des microagrégats de limons ou d'argiles dont la taille peut être inférieure à 20 µm (Owabor & Ogunbor, 2007). La taille des pores de ces particules fines de sol est souvent inférieure aux bactéries elles-mêmes qui ne peuvent directement accéder aux HAP (White et al., 1997). Par conséquent, la dégradation des polluants dépend alors de leur diffusion. Le nombre de bactéries dégradantes peut fluctuer avec la teneur hydrique du sol, influençant la biodisponibilité des HAP par solvatation (Alexander, 2000).

Les composés hydrophobes comme les HAP ont aussi tendance à s'adsorber à la matière organique contenue dans le sol, diminuant ainsi leur biodisponibilité (Alexander, 2000; Cunningham et al., 1996). Une teneur élevée en carbone organique (>5%) conduit généralement à une forte adsorption et par conséquent, à une faible disponibilité, alors qu'une teneur modérée (1 à 5%) peut être associée à une disponibilité limitée (Strom, 1999).

La compaction du sol influe aussi sur la circulation des nutriments et du dioxygène et par conséquent sur l'approvisionnement en carbone et en énergie de la microflore dégradante (Erickson et al., 1995).

### **Modifications de l'exsudation racinaire**

La composition et la quantité d'exsudats racinaires varient également en fonction de l'espèce de la plante et du cultivar (Belz & Hurle, 2004; Cieśliński et al., 1998), de l'âge et du stade de développement, des caractéristiques physico-chimiques du sol et autres facteurs de stress environnementaux (présence de xénobiotiques) (Bais et al., 2004; Jones et al., 2004; Dzantor, 2007; Nguyen, 2003; Phillips et al., 2009; Yang & Crowley, 2000), ce qui peut avoir un impact direct sur l'activité et la diversité des communautés bactériennes dégradantes (Germida et al., 2002). Hegde et Fletcher (1996) ont, par exemple, relevé des variations saisonnières dans l'exsudation de composés phénoliques totaux en fonction du stade de développement chez le mûrier rouge (*Morus rubra* L.).

L'exsudation de carboxylates, *e.g.* citrate, malate, oxalate, est un mécanisme de mobilisation du phosphore répandu chez les dicotylédones, notamment les *Chenopodiaceae* (Jones, 1998). Krafczyk et ses collaborateurs (1984) ont reporté une exsudation plus importante de sucres, d'acides organiques et d'acides aminés chez le maïs (*Zea mays*) en réponse à des carences en potassium. Les carboxy-anions sécrétés, en plus de diminuer localement le pH, entrent en compétition avec les phosphates inorganiques (Pi) au niveau des sites d'adsorption de la matrice, favorisant leur transfert dans la solution du sol (Jones, 1998). Chez beaucoup de plantes, les déficiences en phosphore entraînent également l'augmentation de la production et de l'exsudation de composés phénoliques, constituant un mécanisme supplémentaire de solubilisation du phosphore (Chishaki & Horiguchi, 1997; Dakora & Phillips, 2002). Cela a notamment été suggéré pour l'acide piscidique (acide tartrique *p*-hydroxyphényle) sécrété par des racines de pois du pigeon (*Cajanus cajan* L.) (Ae et al., 1990).

Certains flavonoides racinaires, *e.g.* rutine, ont aussi été identifiés comme molécules signal capables d'initier la germination des spores et la croissance des hyphes mycéliens (mycorhizes à arbuscules) (Lagrange et al., 2001). Ces composés jouent probablement un rôle d'importance dans l'établissement des symbioses ectomycorrhiziennes, favorisant finalement l'acquisition des nutriments (Harrison, 1997; Steinkellner et al., 2007).

L'acidification de la rhizosphère, engendrée par l'absorption des ions ammonium, pourrait aussi entraîner la libération accrue de composés phénoliques (Römheld, 1987). Ces composés phénoliques sont également impliqués dans les interactions de pathogénicité et d'allélopathie, deux processus pouvant moduler à leur tour l'exsudation racinaire (Lattanzio et al., 2009).

Chez les dicotylédones et les monocotylédones n'appartenant pas aux Graminées, une libération concomitante de carboxylates et de composés phénoliques peut aussi être observée lors d'une déficience en fer. Il s'en suit une complexation et dans certains cas une réduction des ions  $Fe^{3+}$  préalablement à leur absorption au niveau rhizosphérique. L'extrusion de protons semble toutefois demeurer le mécanisme essentiel dans la solubilisation du fer (Jones et al., 1996; Marschner et al., 1986). Certaines espèces témoignent également d'une sécrétion de flavines (Römheld, 1987).

Les graminées en revanche sont capables de libérer des quantités considérables d'acides aminés ou « phytosidérophores ». Ce sont des chélateurs très efficaces des ions  $Fe^{3+}$  et stables même à des valeurs de pH supérieures à 7 (acide mugénique, acide avénique...) (Jones et al., 1996).

La mobilisation des micronutriments (Mn, Zn, Cu), voire de métaux lourds (Cd) et même d'uranium a également été reportée du fait de l'acidification du sol au niveau rhizosphérique et de la complexation avec des acides organiques contenus dans les exsudats, *e.g.* citrate (Dighton, 2001). Les métaux lourds tels que le cadmium, peuvent entraîner une augmentation de l'exsudation d'acides aminés du fait de leur toxicité et de l'altération de la membrane plasmique (Costa et al., 1997).

L'inocuité de l'aluminium en sols acides (pH < 5,0) est par ailleurs rendue possible *via* la complexation des ions avec des carboxylates tels que le citrate, l'oxalate, le tartarate ou encore le malate, empêchant alors l'absorption racinaire (Kochian, 1995).

Certains paramètres physiques sont aussi susceptibles d'influer l'exsudation racinaire. Des variations de température peuvent entraîner des modifications des vitesses de diffusion et de la perméabilité membranaire (Neumann & Römheld, 2000). Une exsudation plus importante de sucres et d'acides aminés a, par exemple, été constatée chez le maïs, le concombre et la fraise exposés à des basses températures (5-10°C). Au contraire, la sécrétion active (associée à des dépenses énergétiques) de composés est généralement inhibée à ces mêmes conditions (Neumann & Römheld, 2000). Les hausses de température peuvent aussi augmenter l'exsudation racinaire, de manière plus significative qu'une hausse en  $CO_2$

(Uselman et al., 2000). Elles seraient cependant compensées par une minéralisation plus importante des composés exsudés (Uselman et al., 2000).

Rovira et ses collaborateurs (Rovira, 1959) ont montré des variations dans la composition et la quantité des acides aminés exsudés chez la tomate et le trèfle, en fonction d'une intensité lumineuse décroissante. Une forte intensité pouvant stimuler en revanche, la libération de phytosidérophore en situation de carence en fer ou en zinc chez le blé et l'orge (Cakmak et al., 1998).

Un stress hydrique peut aussi favoriser la sécrétion d'exsudats et de mucilage du fait de l'impédance mécanique du sol sur les racines (Boeuf et al., 1995). Une situation d'hypoxie peut cependant causer une fermentation alcoolique des sucres contenus dans les tissus racinaires, conduisant à la production et à l'accumulation d'éthanol, d'acide lactique et d'alanine à des niveaux phytotoxiques (Xia & Roberts, 1994). La détoxification par libération de ces composés à l'extérieur des racines peut cependant favoriser le chimiotactisme de microorganismes pathogènes (en particulier avec l'éthanol) et supporter, du fait-même de l'exsudation accrue d'autres composés comme les acides aminés et certains sucres, le développement de ces populations pathogènes (Smucker et al., 1987).

L'ensemble des réponses de la plante aux conditions environnementales peut donc entraîner des modifications de l'exsudation racinaire, induisant des variations dans la structure et l'activité des communautés bactériennes rhizosphériques (incluant les bactéries dégradantes) (Mukerji et al., 2006; Wenzel, 2009).

### **Effets de la température, des teneurs en eau et en dioxygène sur la biodégradation bactérienne**

En général, les taux de dégradation ou de transformation microbienne doublent tous les 10 °C (Bossert & Bartha, 1984). La température optimale pour le métabolisme des bactéries se situe entre 20 et 30°C (Bossert & Bartha, 1984). De plus, la pénétration des tissus racinaires en profondeur dans le sol entraîne un dégagement de chaleur dû aux processus métaboliques cellulaires, favorisant indirectement l'activité biochimique à proximité des racines (Shimp et al., 1993).

La teneur en eau du sol régit directement l'activité microbienne, la croissance des plantes et la quantité de dioxygène disponible pour les processus de respiration. Si le volume d'air représente moins de 10% du volume total d'un pore, la dégradation aérobie ne peut avoir lieu. En effet, une trop grande imbibition d'eau limite les échanges gazeux, favorisant la

création de zones anoxiques. Ces dernières peuvent aussi être localement engendrée par la consommation (et épuisement) en dioxygène liée à l'activité bactérienne. Il en résulte alors une dégradation des composés organiques par voie anaérobique, beaucoup plus lente (Germida et al., 2002; Wilson & Jones, 1993).

### **Effets du pH et de la conductivité électrique**

La majorité des microorganismes du sol peut vivre à des valeurs de pH variant de 5,5 à 8,5. Les processus de biodégradation ont généralement lieu pour des pH allant de 5 à 9; l'optimum étant considéré entre 6,5 à 8,5 unités de pH (Cookson, 1995; Weber & Gainey, 1962). Plus particulièrement, pour la biodégradation des HAP, les valeurs optimales de pH ont été établies entre 7,0 et 7,8 (Cookson, 1995; Wilson & Jones, 1993).

La connaissance du pH des sols peut également fournir des indications supplémentaires quant à la biodisponibilité des nutriments inorganiques. Une baisse du pH dans la zone rhizosphérique, par la libération d'ions  $\text{HCO}_3^-$  ou  $\text{H}^+$  par les racines, favorise l'absorption du phosphore. La solubilité de cet élément est maximale à un pH voisin de 6,5, une alcalinisation du milieu pouvant entraîner la précipitation de sels de phosphates de calcium (Krogstad et al., 2005). A l'inverse, l'acidification du sol entraîne la dissolution d'oxydes de fer et d'aluminium pouvant précipiter par la suite sous forme de sels de phosphate (Krogstad et al., 2005).

La diminution de pH est aussi susceptible d'entraîner la dissolution des métaux immobilisés sous forme d'oxydes dans les sols (Chuan et al., 1996; Martínez & Motto, 2000). Une diminution de pH en sol calcaire (18,8 g/kg de carbone inorganique, pH 8,2) augmente, en particulier, de manière significative le relargage des métaux ayant réagi avec les carbonates (Martínez & Motto, 2000). Leur mobilité, leur biodisponibilité et leur toxicité vis-à-vis des plantes et microorganismes peuvent dans ces conditions être accrues (Chuan et al., 1996; Martínez & Motto, 2000).

Enfin, l'acidification du sol modifie les forces de sorption entre les composés hydrophobes comme les HAP et la matière organique du sol (Murphy et al., 1994). Lorsque le pH diminue, le matériel humique subit une protonation ( $\text{H}^+$ ), induisant une diminution de sa polarité (Ping et al., 2006). Il en résulte une plus grande affinité pour les molécules hydrophobes comme les HAP (Ping et al., 2006). L'adsorption constituant un mécanisme majeur de la diminution de la disponibilité des HAP dans les sols, elle tend par conséquent à augmenter (Murphy et al., 1994; Ping et al., 2006; Yang et al., 2001). Toutefois, cette

corrélation entre le pH du sol et la disponibilité des polluants organiques n'est pas toujours observée, nécessitant la localisation des HAP dans le sol (Amellal et al., 2001).

La détermination de la conductivité électrique est une mesure indirecte de la salinité, elle-même relative à la force ionique. Il n'y a pas de relation directe entre la conductivité électrique et la teneur en sels totaux du fait des différences de conductivité ioniques des espèces en solution et de l'influence relative des particules de sol électriquement chargées. Toutefois, la force ionique est un paramètre affectant les interactions électrostatiques entre les molécules (interactions coulombiques) et, par conséquent, la plupart des réactions biochimiques. L'augmentation de la force ionique tend généralement à diminuer la solubilité des HAP et à augmenter leur coefficients de sorption (Eganhouse & Calder, 1976; Karickhoff et al., 1979) ce qui s'explique notamment par l'établissement de ponts salins entre groupements négatifs des acides humiques, favorisant l'adsorption des HAP aux particules organiques (Engelbreton et al., 1994; von Wandruszka, 1998). Le maintien des processus biologiques nécessite généralement que la force ionique ne dépasse pas 0,032 soit une conductivité électrique de 2000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  de la solution du sol (Kastner et al., 1998).

### **Disponibilité en nutriments**

La contamination en hydrocarbures, en particulier par les HAP, peut engendrer à moyen terme une réduction significative de la quantité de nutriments disponibles pour les plantes dans les sols (Xu et al., 1997). En effet, les hydrocarbures constituent une source importante de carbone, mais ne contiennent ni azote ni phosphore. Lorsque les microorganismes dégradent les HAP, ils puisent en même temps les nutriments disponibles dans le milieu, entraînant des déficiences et accentuant les phénomènes de compétition pré-existants (Kaye & Hart, 1997). De plus, la contamination en hydrocarbure peut être toxique pour certaines populations bactériennes et fongiques impliquées dans les cycles biogéochimiques, amplifiant les carences des plantes en nutriments (Muratova et al., 2003).

En général, un ratio C/N/P de 120/10/1 [mg] est considéré comme optimal pour la croissance des bactéries en présence de contaminants (Wilson & Jones, 1993). De manière plus spécifique à la bioremédiation des sols, la plupart des études font état d'un ratio C/N/P optimal de 120/14/3 [mg] soit 100/10/1 [mole] (Bouchez et al., 1995; Cookson, 1995).

## **Multi-contamination**

Les sols des sites industriels concernés par des pollutions organiques de type hydrocarbures sont généralement contaminés par d'autres composés tels que des métaux (chrome, plomb, zinc, nickel, cuivre, cadmium, mercure), des cyanures et autres substances chimiques susceptibles de réagir avec les différentes composantes cellulaires (Cunningham et al., 1996). De fortes concentrations en sels sodiques ( $\text{Na}^+$ ) peuvent aussi être relevées (Cunningham et al., 1996). La capacité des bactéries des sols de friches à dégrader les HAP durant la bioremediation *in situ* est conditionnée, en particulier, par leur niveau de résistance à de hautes concentrations en métaux et par les effets biologiques de ces derniers sur les processus de dégradation (Kozlova et al., 2004). Les effets toxiques des métaux peuvent se traduire par des phénomènes de déshydratation cellulaires, de dénaturation des protéines et l'inactivation des systèmes enzymatiques, conduisant finalement à l'inhibition de la biodégradation des HAP par les bactéries, mais aussi à l'inhibition de croissance des végétaux (Alexander, 1995; Cunningham et al., 1996; Gerhardt et al., 2009). Cependant, la tolérance et l'adaptation des microorganismes aux métaux lourds dans les sols pollués est un phénomène fréquent (Arnebrant et al., 1987; Ríha et al., 1993; Sokhn et al., 2001). La plupart des travaux relatifs à l'isolement de bactéries dégradantes sont réalisés à partir d'environnements pollués (sols de friches, effluents industriels, boues de station d'épuration, etc) à la fois par des contaminants organiques et métalliques.

L'adaptation concomitante des populations bactériennes du sol à la présence de polluants inorganiques et à l'utilisation de sources de carbone exogène comme les HAP constituent un avantage compétitif au sein des communautés telluriques. Plusieurs études se sont particulièrement intéressées à la biodégradation des HAP en présence des métaux (Kozlova et al., 2004; Ríha et al., 1993; Sokhn et al., 2001; Yeom & Yoo, 1997). Les technologies de recombinaisons génétiques ont également permis la création de nouvelles souches multirésistantes, à capacité de dégradation d'hydrocarbures aromatiques (Siunova et al., 2007).

## **Microorganismes et plantes non-natifs**

Différentes stratégies ont été testées afin d'améliorer les processus de rhizodégradation, parmi lesquelles on retrouve la bioaugmentation, ou inoculation du sol en microorganismes dégradants (génétiquement modifiés ou non). Les résultats obtenus sont très contrastés, soulignant l'importance de l'échelle expérimentale et de la biodisponibilité

des contaminants. En effet, certaines tentatives de bioaugmentation réalisées en microcosmes semblent prometteuses, indiquant une dissipation plus conséquente des polluants en présence d'un inoculum bactérien (Grosser et al., 1991; Madsen et al., 1997) alors que d'autres essais peuvent se révéler sans effet (Kastner et al., 1998; van Dillewijn et al., 2007). Dans ces situations, il semblerait que les bactéries exogènes, bien qu'apportées à des densités de l'ordre de  $10^6$  cellules/g de sol, ne soient pas suffisamment compétitives par rapport à la microflore indigène pour s'établir de manière stable dans les sols (Cunningham et al., 1996; Kastner et al., 1998). Transposés au terrain, en situation de sols de friche à contamination ancienne, les tentatives de bioaugmentations se révèlent souvent non concluantes (Johnsen et al., 2005; van Dillewijn et al., 2007).

Lorsqu'il s'agit d'introduire des souches bactériennes génétiquement modifiées, la possibilité de transfert du matériel génétique à des microorganismes indigènes entraîne un risque sanitaire supplémentaire lié aux transferts de gènes de résistance aux antibiotiques à des bactéries pathogènes non ciblées par exemple. Des souches recombinantes possédant un gène de résistance à un antibiotique (marqueur de sélection des souches recombinées) issu de la procédure de clonage ne peuvent ainsi être introduites dans l'environnement sans système de confinement adéquat, *i.e.* insert de gènes létaux ou inhibiteurs de croissance dont l'expression est induite en absence de contaminant (Ronchel & Ramos, 2001; Villaceros et al., 2005). Outre une grande méfiance de la part des instances réglementaires européennes et de la population, le recours à des microorganismes génétiquement modifiés en bioremédiation demeure un challenge scientifique (Gerhardt et al., 2009). La dégradation des HAP lourds requiert en effet l'action concertée de nombreuses enzymes codées par un ensemble de gènes localisés sur de larges plasmides (50 kb à 200 kb) qu'il est difficile à insérer dans le génome d'un seul organisme, qu'il s'agisse d'une bactérie ou d'une plante (Macek et al., 2000). Il est par ailleurs difficile de maintenir la stabilité d'un seul gène dans un organisme génétiquement modifié, des traits phénotypiques comme la capacité accrue à dégrader, étant souvent perdus (Jussila et al., 2007).

D'autres approches ont aussi été développées, reposant non plus sur l'intégration et la stabilité d'une souche bactérienne dégradante dans les communautés rhizosphériques mais sur celle de gènes codant pour des enzymes de dégradation. En effet, les transferts horizontaux de gènes jouent un rôle important dans l'adaptation des communautés bactériennes aux stress environnementaux (Dong et al., 1998). Certaines études ont ainsi montré le transfert de gènes insérés dans des bactéries génétiquement modifiées à celles de la microflore endophyte chez

le peuplier (Taghavi et al., 2005), le blé et le maïs (Wang et al., 2010), leur conférant une plus grande résistance au toluène. Les bactéries endophytes sont des microorganismes non-pathogènes, originaires de la rhizosphère, des graines ou de la phyllosphère, présentes à l'intérieur des tissus de la plupart des végétaux supérieurs. Elles établissent différentes relations symbiotiques, mutualistes, commensalistes ou trophobiotiques avec la plante hôte (Ryan et al., 2008). Ces bactéries regroupent une large variété de phyla et arborent des propriétés de promotion de croissance des plantes ou de contrôle des agents pathogènes (Ryan et al., 2008). De récents travaux indiquent que leurs impacts, en situation de sols pollués, pourraient s'étendre à la dégradation des xénobiotiques présents dans le sol et autres métabolites toxiques absorbés par la plante (Phillips et al., 2008; Siciliano et al., 2001; Taghavi et al., 2005; van der Lelie et al., 2005; Wang et al., 2010). Siciliano et ses collaborateurs ont ainsi montré que la prévalence du gène de la naphthalène dioxygénase *ndoB* au sein de la microflore endophyte de *Festuca arundinacea* était corrélée à la concentration en créosote dans le sol (Siciliano et al., 2001). La manipulation des populations bactériennes endophytes et autres PGPR (« Plant Growth Promoting Rhizobacteria » ou bactéries promouvant la croissance végétale dont sont en partie originaires les bactéries endophytes) constituent un axe de recherche aux potentialités importantes dans le cadre de la phytoremédiation (van der Lelie et al., 2005).

L'utilisation des PGPR constitue également une alternative à forte valeur ajoutée, permettant à la fois l'augmentation de biomasse de la plante (en particulier celle du tissu racinaire) et la rhizodégradation des HAP (Arshad et al., 2007; Gerhardt et al., 2009; Zhuang et al., 2007). En effet, le recours aux PGPR à activité 1-aminocyclopropane-1-acide carboxylique désaminase (ACC désaminase) permet de diminuer la biosynthèse végétale de l'éthylène, phytohormone de stress, *via* l'hydrolyse de son précurseur le 1-aminocyclopropane-1-acide carboxylique (Arshad et al., 2007). Il en résulte la prolifération des racines dans le sol et l'extension de l'effet rhizosphérique dû aux phénomènes de rhizodéposition, aboutissant *in fine* à une rhizodégradation plus importante (Huang et al., 2004). Par ailleurs, beaucoup de PGPR, retrouvés dans les genres *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Azospirillum* sp., peuvent agir à la fois en tant que promoteurs de la croissance des plantes (activité ACC désaminase, synthèse de phytohormone comme les auxines, les gibbérelines et cytokinines, agents de biocontrôle vis-à-vis des pathogènes...) et en tant que souches dégradant les contaminants (éventuellement après modifications génétiques) (Gerhardt et al., 2009; Zhuang et al., 2007). Ils peuvent également jouer le rôle de

biofertilisants à travers la fixation d'azote atmosphérique, la solubilisation de phosphore, de fer, et l'augmentation de la biodisponibilité de ces nutriments pour la croissance végétale (Zhuang et al., 2007).

Les associations mycorhyziennes (ectomycorhizes et endomycorhizes dont ceux à arbuscules) peuvent aussi constituer des adjuvants à la rhizodégradation des HAP (Joner & Leyval, 2003; Meharg & Cairney, 2000). Les mycorhizes peuvent revêtir un rôle de protection en conférant aux racines une barrière biologique contre l'exposition directe aux polluants, ou en absorbant certains métaux potentiellement toxiques pour les bactéries et la plante (Ashford et al., 1988; Leyval et al., 1998). Ils permettent également à la plante une meilleure acquisition des nutriments tout en favorisant la dégradation des contaminants dans la mycorhizosphère (Gao et al., 2010; Joner & Leyval, 2003; Meharg & Cairney, 2000). Ces effets sont toutefois à mitiger. Les effets potentiellement délétère à long terme de l'absorption significative du fluorène et du phénanthrène par les racines de *Lolium multiflorum* (mycorhizées par *Glomus mosseae* et *Glomus etunicatum*) (Gao et al., 2010), ou encore l'inhibition de biodégradation des HAP observée par Leyval et ses collaborateurs (Joner et al., 2006) rappellent la nécessité d'approfondir les études avant la généralisation d'essais *in situ*.

### **Plantes**

Le recours aux microorganismes non natifs (bactéries et champignons) a essentiellement pour but de favoriser la croissance végétale. L'augmentation de biomasse souterraine qui en découle, permet d'établir des conditions plus favorables aux processus de rhizodégradation *ex planta*. Les plantes choisies pour les programmes de phytoremédiation doivent par conséquent être adaptées au sol (caractéristiques physico-chimiques, tolérance aux polluants...), au climat de la région (températures moyennes, pluviométrie, durée de la phase de croissance végétative...), et aux stress biotiques (herbivorie insectes/animaux, attaques pathogènes) en témoignant en particulier de résistance face aux compétitions avec les autres espèces végétales du site, tout en garantissant de leur caractère non-invasif (Collins, 2007; Cunningham et al., 1996; Newman et al., 1998). Une récente campagne d'essais de phytoremédiation au niveau d'un site pollué par des hydrocarbures au centre spatial Kennedy a, par exemple, échoué en raison de la sécheresse et de la compétition avec les herbes du site (Collins, 2007). Ainsi, outre la minimisation des risques écologiques associés à l'introduction de plantes non-natives, l'intérêt majeur porté à l'utilisation de plantes (et de microorganismes)

natifs réside dans leur adaptation aux contraintes abiotiques et biotiques du site à remédier (Gerhardt et al., 2009).

L'utilisation d'espèces transgéniques dans la biodégradation des HAP est plus difficile à mettre en œuvre en raison du nombre de gènes impliqués (Macek et al., 2000) et des mécanismes épigénétiques de méthylation des groupements cytosine des ADN exogènes, rendant cette technologie particulièrement imprévisible (Matzke & Matzke, 1998). Toutefois, certains essais portant notamment sur les gènes impliqués dans la synthèse du glutathion, molécule utilisée dans les mécanismes de détoxification de phase II (conjugaison des xénobiotiques à des groupements hydrophiles), ouvrent de nouvelles pistes de recherche. Des individus de *Brassica juncea*, surexprimant les gènes ECS (γ-glutamylcystéine-synthase) et GS (glutathion-synthase) ont ainsi témoigné une tolérance non seulement à des concentrations élevées en métaux, mais aussi en phénanthrène (100 et 200 mg.L<sup>-1</sup>) et d'autres composés organiques (atrazine, métachlore) (Flocco et al., 2004).

#### **1.2.4. Revégétalisation des sols dégradés à faible potentiel agronomique : cas des cendres volantes**

Les études menées sur les possibilités de revégétalisation des cendres à grande échelle *in situ* témoignent de certaines difficultés relatives à l'implantation de cultivars dans ce matériau aux caractéristiques physiques, chimiques et microbiologiques très particulières. Les propriétés pouzzolaniques de certaines cendres peuvent, par exemple, restreindre la croissance et la pénétration des racines, suite à la compaction des particules fines et à la formation de couches cimentées (Carlson et al., 1993; Haynes, 2009).

Un pH trop élevé (supérieur à 8,5), une forte concentration en sels hydrosolubles, parfois associés à une teneur importante en bore et autres éléments (traces métalliques) peuvent aussi freiner le développement des plantules (Carlson et al., 1993). De même, des déficiences en macronutriments, essentiellement l'azote et le phosphore, peuvent constituer des contraintes majeures à l'établissement d'un couvert végétal permanent (Adriano et al., 1980; Carlson et al., 1993).

Enfin, la diversité, la taille et l'activité des communautés microbiennes habituellement présentes dans les sols (en particulier les organismes symbiotiques de type bactéries azotofixatrices et champignons mycorhiziens), sont très limitées dans les cendres du fait de la pauvreté en azote et en carbone biologiquement actifs (Klubek et al., 1992).

En raison de ces divers aspects, le choix des espèces végétales à planter apparaît comme déterminant dans le succès des programmes de réhabilitation des parcs à cendres (Dinger & Falcy, 2002). Les espèces végétales appartenant à la famille des légumineuses ont la propriété de favoriser la fixation d'azote atmosphérique *via* les associations symbiotiques avec des bactéries fixatrices du genre *Rhizogium* sp. au niveau de nodules racinaires et de là d'améliorer la teneur en éléments nutritifs des sols. Leur utilisation pour la revégétalisation des cendres pourrait s'avérer bénéfique en vue de l'installation d'un couvert végétal pérenne (Dinger & Falcy, 2002).

L'implantation et le développement rapide d'un couvert végétal peuvent aussi être favorisés par une « voie améliorative » se traduisant par l'emploi d'amendements divers comme « barrière biologique » temporaire (Choi, 2004). Cette voie peut correspondre à un apport direct de fertilisants (et de co-substrats pour les microorganismes telluriques) de type engrais chimique, ou d'une couche de surface constituée d'un matériau terrigène ou de compost. La voie améliorative présente plusieurs avantages en végétalisation (Choi, 2004; García-Gil et al., 2000; Wali, 1999) tels que l'amélioration immédiate de la qualité du substrat (apports en nutriments, meilleure capacité d'échange cationique et pouvoir tampon du sol, immobilisation de micropolluants par phénomènes de complexation aux matrices organominérales...), l'amélioration de l'aération du sol, l'augmentation de la biodiversité et de l'activité des microorganismes. Dans la mesure où il peut être préférable de conserver la valeur basique initiale du pH des cendres pour favoriser l'immobilisation de métaux lourds en concentrations potentiellement phytotoxiques, l'amendement est parfois préconisé en couche de surface, sans incorporation directe avec le substrat « cendres » (Dinger & Falcy, 2002). Le programme de revégétalisation mené au niveau de l'ancienne centrale thermique de Pont-sur-Sambre dans le nord de la France entre les années 2000 et 2001 a ainsi permis de vérifier que (Dinger & Falcy, 2002) :

- l'introduction de légumineuses (*Lolium perenne*) dans le mélange de cultivars assure un processus d'auto-fertilisation du sol en azote. L'apport d'engrais n'a d'ailleurs révélé aucun effet bénéfique particulier sur le développement et la croissance des plantes *in situ*.

- la formation rapide d'un couvert végétal dense sur le terril ne peut être envisagée sans un apport en matières organiques, afin de compenser les contraintes biologiques et physiques propres au substrat étudié (faible capacité de rétention en eau, absence de complexe argilo-humique, phénomène de cimentation etc).

A l'inverse, les cendres peuvent être utilisées comme amendements dans des terres agricoles ou des sols dégradés afin d'en améliorer les propriétés physico-chimiques et biologiques. L'épandage de cendres dans les sols sableux et sablo-argileux permet généralement d'obtenir une texture limoneuse, résultant en l'augmentation de la microporosité et de la capacité de rétention d'eau du substrat (jusqu'à deux fois plus importante pour un apport en cendres de 30% P/P) (Fail & Wochok, 1977; Ghodrati et al., 1995). En outre, l'alcalinité des cendres permet de les substituer à la chaux pour réduire l'acidité de sols agricoles ou de friche telles que les anciennes mines à charbon (Mishra & Shukla, 1986; Ram et al., 2006). La fertilité des sols s'en retrouve améliorée, accentuée par l'apport direct de macro- et micro-nutriments (P, K, Ca, Mg, Mn, Zn, bicarbonates, sulfates) (Khan & Singh, 2001). Le mélange de cendres calcaïques aux boues d'épandage peut également limiter la lixiviation des éléments nutritifs pour les plantes tout en diminuant la disponibilité en métaux lourds (Ram et al., 2007). Des études ont aussi porté sur l'utilisation des cendres volantes mélangées à d'autres types de déchets issus d'élevage de volailles (Lau et al., 2001; Punshon et al., 2002; Wong & Su, 1997). De par l'amélioration de la qualité globale des sols, les amendements en cendres sont également susceptible de favoriser la croissance et l'activité des microorganismes (Schutter & Fuhrmann, 2001). Wong et Wongz (1987) ont ainsi montré que l'addition de cendres à un sol sableux pouvait augmenter la respiration microbienne alors qu'elle la diminuait dans un sol sablo-limoneux. Toutefois, d'après Kalra et ses collaborateurs (1997), l'activité microbienne dans les sols serait favorisée pour des mélanges sol-cendres à de faibles quantités, ne dépassant pas 5% (P/P) de la teneur en matériau ajouté.

### **I.3. Choix de *Miscanthus x giganteus* (MxG) dans la phytoremédiation**

#### **I.3.1. Présentation du matériel biologique**

*Miscanthus* est une herbe vivace à rhizomes, originaire des régions tropicales et subtropicales d'Asie du Sud-Est (Greef & Deuter, 1993). Elle fait partie des quelques végétaux à photosynthèse en C<sub>4</sub> naturellement retrouvés aux climats tempérés (Long, 1983). *Miscanthus* a d'abord été introduit du Japon en Europe (Danemark) dans les années 1930 en

tant que plante ornementale (Lewandowski et al., 2000). *Miscanthus sinensis* cv. *Giganteus*, plus communément appelé *Miscanthus x giganteus* (MxG), est particulièrement remarquable de part ses caractéristiques culturales et sa forte production de biomasse. Son utilisation en tant que culture bioénergétique a été évaluée au cours de ces trente dernières années. Différents programmes ont ainsi vu le jour au Danemark dès 1983, s'étendant peu à peu à travers l'Europe (Allemagne, Irlande et Royaume-Uni, Grèce, Italie, Autriche, Espagne, Portugal, Pays-Bas, Suisse, France) et plus récemment aux Etats-Unis (Clifton-Brown et al., 2004; Lewandowski et al., 2000; Lewandowski et al., 2003; Pyter et al., 2009). Son intérêt en tant que biomasse à vocation non-alimentaire réside à la fois dans sa période de renouvellement rapide, *i.e.* chaque année contre 20 ans pour le bois, et la possibilité de culture sur des terres non agricoles, en l'occurrence les sols de friches potentiellement pollués (Fernando et al., 2004). Ces sols dégradés (sols de friches industrielles, terrils/parcs à cendres volantes à faible potentiel agronomique) constituent une opportunité d'exploitation de la complémentarité entre la production de biomasse et la phytoremédiation avec MxG pour leur réhabilitation. En effet, MxG est une plante possédant des capacités d'adaptation à une large gamme de sols, sans recommandation particulière en terme de fertilisation ou de pesticides (Lewandowski et al., 2000). C'est pourquoi cette plante a été choisie dans le cadre de cette étude sur la revégétalisation et la phytoremédiation de sols de friches industrielles, potentiellement pollués en HAP.

### Taxonomie et cycle de vie

Le genre *Miscanthus* fait parti de la tribu des *Andropogoneae* (Figure 13), qui comprend également les *Sorghinae* (incluant *Sorghum bicolor* L.) et les *Tripsacinae* (incluant *Zea mays* L.), tous deux étudiés dans la phytoremédiation des HAP (Muratova et al., 2009; Xu et al., 2006; Yoshitomi & Shann, 2001).

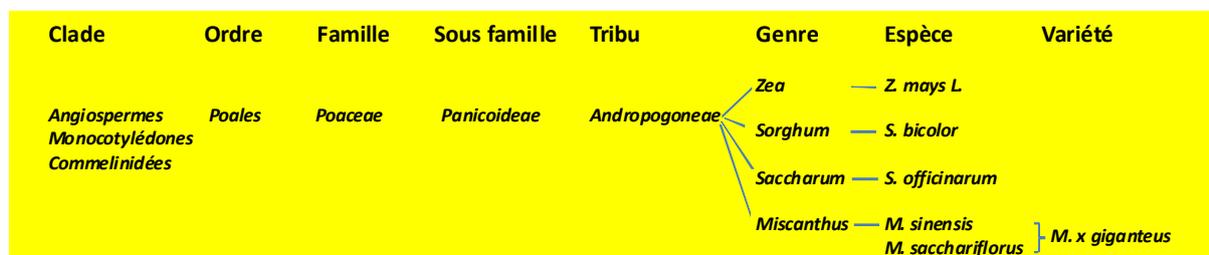
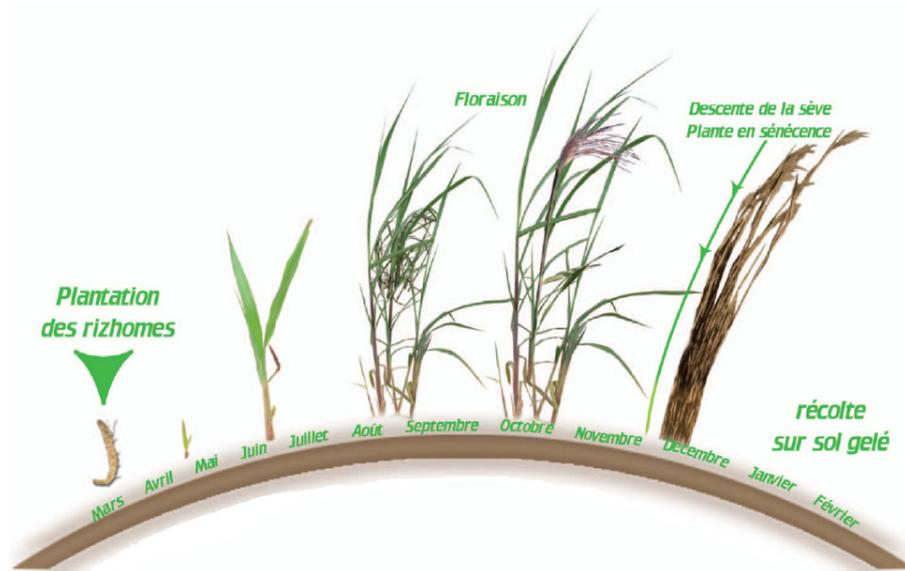


Figure 13 : Taxonomie de *Miscanthus x giganteus* (MxG)

*Miscanthus x giganteus* (MxG) est l'hybride triploïde stérile de *Miscanthus sacchariflorus* x *Miscanthus sinensis* (Greef & Deuter, 1993; Hodkinson et al., 2002). Ses

appellations peuvent différer selon les auteurs : *M. sinensis* var ‘*Giganteus*’ (Schwarz et al., 1994), *M. x ogiformis* Honda ‘*Giganteus*’ (Hansen et al., 1997), *Miscanthus* ‘*Giganteus*’ (Linde-Laursen, 1993) ou bien encore *Miscanthus floridulus* par certains pépiniéristes. Il s’agit d’une graminée pérenne, permettant par conséquent une récolte reproductible chaque année. C’est une plante non invasive, ne se développant que par bourgeonnement des rhizomes au printemps, sans nécessité de les replanter (Clifton-brown et al., 2004; Pyter et al., 2009) (Figure 14).



**Figure 14 : Cycle de développement de *Miscanthus x giganteus* (d’après une conception de MCB communication MSI 2009)**

*Miscanthus* est le plus souvent moissonnée lorsque la culture est sénescente, généralement à la fin de l’automne (Clifton-brown et al., 2004; Lewandowski et al., 2000) (Figure 14). A cette période, les plantes ont déjà perdu une grande partie de leurs feuilles. La machinerie existante pour les moissons de cultures traditionnelles doit subir quelques modifications pour être utilisée à grande échelle (Lewandowski et al., 2000). L’essentiel de la biomasse récoltée est contenue dans les tiges ou chaumes dont le diamètre avoisine le centimètre (Kaack & Schwarz, 2001). Les tiges peuvent dépasser 3 m à l’issue d’une saison de culture pour un rendement global de 10 à 40 t.ha<sup>-1</sup> (Heaton et al., 2004) (Figure 15). Les feuilles sont raides, longues de 50 à 80 cm et larges de 10 à 15 mm en moyenne. Les épis sont nombreux, étroits et groupés en inflorescences ombelliformes (Kaack & Schwarz, 2001).



**Figure 15 : Plantation de *Miscanthus x giganteus***

Des pratiques agricoles contrôlées permettent de maîtriser la propagation végétative par rhizome. Les pollens produits sont exclusivement stériles, empêchant tous échanges génétiques interspécifiques. Les conclusions relatives aux risques biologiques, évalués d'après la méthode de classification des risques germano-suisso-irlandaise (« the Dutch-Swiss-Irish method of classification of risks »), indiquent que tout risque invasif est entièrement écarté tant que la stérilité des grains de pollen et le caractère apomictique de la plante (mode de multiplication asexué avec graine non fécondée) sont conservés (Heaton et al., 2010; Möller et al., 2007).

### **1.3.2. Valorisation de la biomasse**

Les chaumes sont composés de différents types cellulaires à paroi lignocellulosique dont le pouvoir calorifique moyen s'élève à  $16400 \text{ kJ.kg}^{-1}$  (contre  $31000 \text{ kJ.kg}^{-1}$  pour la houille) (Lewandowski et al., 2000). Durant de nombreuses années, l'essentiel de la revalorisation de la biomasse de MxG a consisté en la production de chaleur par combustion de granulés dans des chaudières (Lewandowski et al., 2000). D'autres voies d'utilisation sont désormais envisageables : gazéification/biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération (Michel et al., 2007; Smolinski et al., 2010; Uihlein et al., 2008), couverture des toits de chaume (plus longue résistance à la putréfaction que les pailles traditionnelles) et matériau composite pour la construction (isolant phonique et thermique, béton léger (Uihlein et al., 2008), supports biodégradables (« bio-pots », litières animales), industrie papetière (augmentation de la

résistance de papiers journaux recyclés, (Oggiano et al., 1997), polymères (Johnson et al., 2005; Uihlein et al., 2008), phytoremédiation de sols contaminés en métaux (Fernando et al., 2004).

Si la finalité d'utilisation de la biomasse n'est autre que la combustion ou la gazéification, seuls les paramètres de densité des tiges, de teneur en eau, en cendres et en sulfures sont à prendre en compte (Clifton-brown et al., 2004; Heaton et al., 2004). La biomasse sèche et sa qualité est meilleure lors des moissons automnales, avec un contenu en cendres de 25 g.kg<sup>-1</sup> de matière sèche. Le contenu minéral de MxG est faible comparativement à celui du blé mais élevé par rapport au bois de peuplier ou de saule (teneur en potassium : de 9 à 4 g, en azote : de 5 à 4 g et en chlore : de 4 à 1 g par kg de matière sèche) (Lewandowski et al., 2000). La température de fusion des cendres de MxG est aussi relativement basse (600°C), pouvant toutefois entraîner l'encrassement des brûleurs (Lewandowski et al., 2000). L'établissement d'un procédé de conversion chimique et/ou biologique efficace des polysides constitutifs des parois cellulaires constitue un nouvel axe de recherche d'utilisation bioénergétique prometteur (production de biocarburant, de syngaz (gaz synthétique) avec mise en place de filière de gestion des déchets) (Michel et al., 2007; Uihlein et al., 2008).

### **1.3.3. Résistances aux stress abiotiques et biotiques**

MxG est particulièrement sensible au gel durant la première année de son implantation, lorsque la température descend au-dessous de -3,5°C pour les rhizomes et -8°C pour les jeunes pousses (Lewandowski et al., 2000; Zub & Brancourt-Hulmel, 2010).

MxG est comparativement plus résistante aux pestes et maladies végétales que les autres cultures agricoles, nécessitant très peu voire aucun pesticide (Lewandowski et al., 2000; Walsh & McCarthy, 1998). Quelques maladies ont cependant été reportées au Japon région native de la plante (virus de strie de *Miscanthus*) et aux Etats-Unis (rouille de *Miscanthus*). Ces pathologies n'ont jusqu'à présent pas été répertoriées en Europe, probablement du fait de conditions climatiques défavorables. Quelques cas de fusarioses ont toutefois été relevés en Irlande, ainsi que d'infections par le virus de nain jaune d'orge (virus à ARN) au Royaume-Uni (Heaton et al., 2010). Le suivi des plantations à grande échelle et la mise en quarantaine stricte des plantes issues des pays où *Miscanthus* et *Saccharum* (genre apparenté, Figure 13) sont indigènes devraient permettre de contrôler tous risques d'infections

tout en permettant l'expansion de la culture en Europe (Heaton et al., 2010). Des mesures de protection contre le broutage par les gros et petits gibiers (sangliers, biches, livres) peuvent toutefois s'avérer nécessaire durant la phase de germination des rhizomes (observations personnelles).

Un désherbage (manuel ou mécanique) des parcelles peut être nécessaire durant la première année de croissance des rhizomes. Au fil des années, la croissance des adventices est réduite du fait de la litière se formant suite à la chute des feuilles au sol et de la canopée fermée (offrant un refuge pour plusieurs espèces animales) (Lewandowski et al., 2000).

### **I.3.4. Méthodes de culture**

Actuellement, la plantation de MxG se fait par mise en terre de rhizomes ou de jeunes plants (Lewandowski et al., 2000). La plupart des cultures en Europe a été établie à partir de plantes multipliées *in vitro*. Les individus issus de micro-propagation sont plus sensibles au gel que les rhizomes (Lewandowski et al., 2000). La multiplication par culture cellulaire n'est, par contre, pas encore au point mais a déjà permis l'obtention de calcs (Heaton et al., 2010). Afin d'assurer une implantation en champ réussie des rhizomes, ces derniers doivent avoir une taille comprise entre 10 et 20 cm, de nombreux bourgeons, et être plantés à une profondeur d'au moins 20 cm (Pyter et al., 2010; Walsh & McCarthy, 1998). Il est également préférable de disposer de rhizomes directement issus de la plante mère et mis en terre peu de temps après la récolte (Walsh & McCarthy, 1998). La plantation s'effectuent généralement entre mars et mai. La durée nécessaire à une plantation de MxG pour donner son rendement maximum peut prendre de 2 à 5 ans en fonction des conditions climatiques (Lewandowski et al., 2000; Walsh & McCarthy, 1998).

### **I.3.5. Caractéristiques agronomiques et aspects environnementaux**

*Miscanthus* se développe sur une grande variété de sols, incluant aussi bien les sols à texture sableuse que ceux à forte teneur en matière organique. Le pH optimal de croissance se situe entre 5,5 et 7,5 mais les plantes peuvent tolérer des conditions plus acides ou alcalines (Lewandowski et al., 2003).

De par son métabolisme en C<sub>4</sub>, *Miscanthus* a une meilleure utilisation des radiations solaires, de l'eau et des nutriments que beaucoup d'autres plantes (Lewandowski et al., 2000).

Elle demeure, par exemple, photosynthétiquement active jusqu'à 5°C alors que le seuil d'activité photosynthétique du maïs n'est évalué qu'à 14°C (Naidu et al., 2003).

Sa tolérance à la sécheresse est plus élevée que celle du peuplier ou du saule bien que les rendements augmentent fortement en fonction des précipitations, comme l'a montré la méta-analyse de Heaton et collaborateurs, avec une production passant de 19 t.ha<sup>-1</sup> à 300 mm de pluie à 30 t.ha<sup>-1</sup> avec 650 mm de précipitation durant la période de croissance (Heaton et al., 2004). La biomasse souterraine produite par litre d'eau consommée est de 9,5 g.L<sup>-1</sup>, ce qui est dans la gamme habituellement produite par les plantes en C<sub>4</sub> mais plus élevée que celle des plantes en C<sub>3</sub> (Beale et al., 1999).

Les besoins en fertilisants sont faibles du fait de la translocation d'une partie des nutriments, en particulier l'azote, des parties aériennes au rhizome en automne, et sa réutilisation à la saison suivante lors de l'émergence de nouvelles tiges (Beale & Long, 1997). Heaton et ses collaborateurs (2004) ont ainsi montré que les rendements de MxG pouvaient atteindre 24 t.ha<sup>-1</sup> sans aucun apport azoté. Lewandowski et Schmidt ont ainsi établi une fertilisation optimale en azote à 114 kg. ha<sup>-1</sup>, des quantités plus élevées diminuant les rendements (Lewandowski et al., 2006). La lixiviation en nitrates, alors négligeable, est sans risque de contamination des nappes phréatiques (Christian et al., 1998).

Les coûts potentiellement élevés pour la mise en place de la culture les deux premières années sont finalement compensés par l'« auto-entretien » de la plantation dont la durée de vie moyenne est d'environ 20 ans (non remplacement des rhizomes, fertilisation et utilisation de pesticides très faible à inexistante) (Lewandowski et al., 2003). De plus, comparée à celle des cultures à rotation courte, MxG produit une biomasse plus élevée une fois la culture installée. Un rendement moyen de 22,4 t de matière sèche par ha et par an, peut être espéré en Europe Centrale pour MxG, contre 10 t.ha<sup>-1</sup> pour *Panicum virgatum* L., autre plante pérenne de référence en production de biomasse (Heaton et al., 2004; Lewandowski et al., 2003). Enfin, les parcelles plantées peuvent être reconverties après arrachage des rhizomes et racines de MxG, plus facilement extractibles que les racines des peupliers ou des saules par exemple. Il est par ailleurs possible de réutiliser ces mêmes rhizomes en les réimplantent directement sur d'autres parcelles (Pyter et al., 2010; Walsh & McCarthy, 1998).

### **Gaz à effet de serre et séquestration du carbone**

Pour les sols non fertilisés, une diminution significative des émissions de gaz à effet de serre tel que le protoxyde d'azote (N<sub>2</sub>O) a été enregistrée (Jørgensen et al., 1997). Les

émissions en CO<sub>2</sub> peuvent aussi être réduites si la biomasse de MxG est utilisée en tant que biocarburant solide au lieu de carburants fossiles solides (charbon). Les économies en émissions de CO<sub>2</sub> sont par contre moindres lorsqu'il s'agit de biocarburants liquides (bioéthanol) du fait de la demande énergétique plus importante lors de la production de ce type de carburant (Lewandowski & Heinz, 2003).

La culture de plantes pérennes peut aussi séquestrer une partie du carbone atmosphérique directement dans le sol. Les feuilles de MxG perdues à l'approche de l'hiver contribuent à ce stockage du carbone. La modélisation de ce phénomène par Clifton-Brown et ses collaborateurs (2004) au niveau européen a permis d'estimer le taux de carbone ainsi immobilisé à 0,93 t par ha et par an, un taux plus important que pour les cultures à courte rotation (Clifton-Brown et al., 2004).

### **1.3.6. Revégétalisation et phytoremédiation des sols**

L'apport en matière organique conséquent à la culture d'une autre espèce du genre *Miscanthus*, (*Miscanthus nepalensis*, plante pionnière au sud-est de la Chine), dans une ancienne mine de plomb et de zinc s'est révélé notable dans la fertilité générale du sol (Lei & Duan, 2008). De plus, l'étude à long terme de l'impact d'une culture établie de MxG (4 à 8 ans) a montré un apport en matière organique au sol similaire à celui d'un épandage en fumier de ferme (Kahle et al., 2001), suggérant des capacités de restauration de sols non négligeables.

*Miscanthus sinensis* (espèce dont est apparentée MxG) est souvent retrouvée parmi les espèces pionnières dans la recolonisation des régions dévastées par les éruptions volcaniques au Japon. Dans ces zones aux caractéristiques physico-chimiques similaires aux cendres de charbon (Zikeli et al., 2005), la teneur des sols en azote est généralement très faible. Inspirés notamment par cette observation, Miyamoto et ses collaborateurs (Miyamoto et al., 2004) isolèrent une nouvelle souche bactérienne endophyte fixatrice d'azote présente dans les feuilles, tiges et racines de *Miscanthus sinensis*. Avant eux, Kirschhof et ses collaborateurs (1997), isolèrent et caractérisèrent 19 souches apparentées aux genres *Azospirillum* et *Herbaspirillum* chez *Miscanthus sinensis* cv. *giganteus* (MxG) et *Miscanthus sacchariflorus* (Kirschhof et al., 1997). Eckert et ses collaborateurs réitérèrent l'expérience en isolant un nouveau groupe de *Azospirillum doebereineri* sp. nov., fixateur d'azote, en 2001 (Eckert et al., 2001). Plus récemment, des capacités de résistance accrues à de fortes concentrations en sels dans les sols chez *Miscanthus sinensis* ont pu être montrées suite à l'inoculation par des

souches endophytes également impliquées dans la fixation d'azote, *Clostridium* sp. *Kas201-1* et *Enterobacter* sp. *B901-2* (Ye et al., 2005). La mycorhization potentiellement importante de MxG pourrait par ailleurs être un facteur expliquant la résistance de la plante à certains éléments métalliques présents dans les sols, tout en jouant un rôle prépondérant dans l'assimilation de macronutriments comme le phosphore (Leung et al., 2007).

Par ailleurs, un des groupes de composés les plus importants dans la colonisation racinaire par les microorganismes (symbioses ou coopération) sont les molécules de type flavonoïdes et coumarines, potentiellement impliquées dans les phénomènes de biodégradation des HAP par co-métabolisme (Gerhardt et al., 2009; Shaw et al., 2006; Singer et al., 2003). Ces divers éléments attestent de la complexité des interactions plante-microorganismes au niveau rhizosphérique et pourraient constituer des éléments d'explication au pouvoir adaptatif de MxG à une grande variété de sols (Lewandowski & Schmidt, 2006).

Plusieurs études réalisées en culture hydroponique ont montré une tolérance de MxG à divers éléments traces métalliques ainsi qu'un transfert limité de ces éléments vers les parties aériennes. Il s'agit notamment du cadmium (croissance arrêtée entre 2,25 - 3 mg Cd/L) (Arduini et al., 2006; Arduini et al., 2004) et du chrome (croissance stoppée à partir de 150 mg/L) (Arduini et al., 2006). Ceci a également été observé dans quelques expérimentations *in situ* d'un à deux cycles végétatifs. La culture de *Miscanthus* sur des déchets miniers et des sols pollués par du cuivre, du zinc et de l'arsenic a été étudiée pendant deux ans (Bullard et al., 1996; Visser et al., 2001). Les résultats ont montré que le cuivre, l'arsenic et le zinc, contenus dans la biomasse aérienne, étaient présents à des teneurs légèrement supérieures dans les plantes cultivées sur des sols pollués. Cependant, il n'y avait pas de corrélation avec les teneurs en métaux dans les sols, confirmant un phénomène de tolérance aux métaux davantage que de phytoextraction et de bioaccumulation dans les parties aériennes (Bullard et al., 1996; Visser et al., 2001).

Des résultats similaires obtenus à partir de croissance sur sols avec épandages de boues industrielles ont indiqué l'accumulation de métaux lourds dans les racines et les rhizomes de la plante mais pas de translocation qui soit corrélée aux teneurs du substrat vers les parties aériennes (Fernando et al., 2004). Ezaki et ses collaborateurs ont quant à eux mis en évidence la tolérance de *Miscanthus sinensis* Anders à l'aluminium (jusqu'à 900  $\mu$ M), ainsi qu'au chrome, au zinc, au diamide et au peroxyde d'hydrogène, suggérant notamment des systèmes de transport de l'aluminium des racines vers les tiges associés à l'induction d'enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase) (Ezaki et al., 2008). Cette

tolérance importante à l'aluminium est d'un intérêt particulier dans la mesure où un trait similaire chez MxG conférerait des capacités d'adaptation indéniables pour la croissance dans les cendres volantes, d'origine silico-alumineuses. Les sols de friche étant généralement caractérisés par une pollution à la fois minérale et organique, la tolérance de MxG aux métaux lourds ainsi que les associations symbiotiques de nature mycorhizienne constituent autant d'atouts pour l'installation de la plante et le développement des interactions conduisant aux processus de bioremédiation.

La pérennisation du processus de phytoremédiation, se déroulant sur plusieurs saisons de culture, nécessite la mise en place de micro-filières garantissant la rentabilité économique du programme à long terme (Vangronsveld et al., 2009). L'utilisation d'une plante à production de biomasse vise à répondre à cette exigence socio-économique. Quelques programmes de phytoremédiation de sols contaminés par des métaux ont commencé à voir le jour mais à notre connaissance, aucun ne s'est encore focalisé sur la rhizoremédiation des sols pollués par les HAP, ni à la revégétalisation de substrat à faible capacité agronomique comme les cendres volantes grâce à MxG. Les intérêts sont pourtant multiples : l'exploitation durable de la restitution d'un usage à ces terres délaissées (production et valorisation de biomasse) associée à leur réhabilitation (revégétalisation, phytoremédiation et intérêt paysager) et à l'économie subséquente de terres agricoles.

## **I.4. Conclusion et objectifs de recherche**

Le déclin des activités industrielles liées à l'épuisement des ressources minières (charbon essentiellement) a entraîné l'apparition de milliers d'hectares de friches en région Lorraine. La reconversion « immédiate » des surfaces concernées en terres agricoles, par exemple, est impossible en raison du faible potentiel agronomique des sols et de la présence de micropolluants (hydrocarbures, métaux, cyanures etc); ces derniers constituant un risque sanitaire pour l'homme et l'environnement.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants retrouvés de manière ubiquistes dans les écosystèmes. La contamination de l'environnement résultant des activités humaines est la cause majeure de leur émission. Les niveaux de contamination les plus importants sont localisés et spécifiques aux sites industriels. Ces molécules organiques témoignent d'une grande stabilité électrochimique, ce qui leur confère une

résistance aux attaques nucléophiles et un caractère hydrophobe croissant avec le nombre de cycles. Ils sont généralement retrouvés à l'état adsorbé à la matière organique dans les sols ou séquestrés à l'intérieur des microagrégats suite aux phénomènes de « vieillissement » des matrices. Les HAP sont classés parmi les « Polluants Organiques Persistants » (POP) du fait de leurs caractères rémanent et récalcitrant à la dégradation. 16 d'entre eux ont ainsi été établis comme prioritaires à éliminer des sols. Certains sont potentiellement bioaccumulables, mutagènes, cancérigènes et toxiques pour la reproduction.

La biodégradation des HAP par la microflore indigène des sols apparaît comme le phénomène majeur affectant le devenir de ces molécules. Elle est essentiellement fonction de la présence de bactéries compétentes; c'est-à-dire adaptées à la dégradation grâce à des mécanismes facilitant l'absorption des micropolluants (surfactants, formation de biofilms, etc) et possédant le « cortège enzymatique » nécessaire au catabolisme. Les actions successives des enzymes agissant dans la biodégradation des HAP (dioxygénases, déshydrogénases) permettent l'ouverture progressive des cycles aromatiques, conduisant à la production de métabolites intermédiaires de dégradation. Ces molécules sont plus solubles et réactives que les molécules mères, pouvant alors être dégradées ou assimilées par d'autres microorganismes (bactéries, champignons, algues). Ces intermédiaires ainsi que toutes autres molécules présentant des analogies structurales, aussi bien des composés d'origine pétrogénique que biologique, sont également susceptibles d'induire l'expression génique des enzymes impliquées dans la dégradation des HAP. C'est sur ce principe et sur l'existence de substances d'origine végétale capables de soutenir de manière globale le métabolisme et le développement des communautés bactériennes, que se base la phytoremédiation des HAP et en particulier leur rhizoremédiation. En effet, la sécrétion et la diffusion passive de molécules carbonées facilement assimilables au niveau racinaire (sucres, acide aminés, acides organiques...) participent à l'induction de « l'effet rhizosphérique ». Ce phénomène se traduit notamment par une stimulation des communautés bactériennes autochtones, aussi bien celles capables de dégrader les HAP que celles promouvant la croissance de la plante (lutte contre les agents pathogènes, augmentation de la disponibilité en nutriments indispensables aux végétaux).

Outre les sols de friches pollués par les HAP, d'autres sites posent également la question de gestion des risques environnementaux liés aux anciennes activités industrielles. Les parcs à cendres constituent des bassins de stockage de cendres volantes issues de la combustion du charbon dans les centrales thermiques. Les stocks entreposés représentent des

volumes considérables de matériau à traiter, avec, par exemple, plus de 4 800 000 tonnes uniquement en région Lorraine. Bien que les teneurs en contaminants des cendres ne constituent pas de risque direct pour l'environnement (d'après les évaluations écotoxicologiques au niveau national), la finesse des grains et la surface spécifique importante associées à leur caractère pulvérulent nécessitent la mise en place de mesures de stabilisation du matériau. L'établissement d'un couvert végétal réduisant l'envol des cendres constituerait une stratégie de réhabilitation durable et à moindre coût. La revégétalisation et la phytostabilisation subséquente du matériau requiert toutefois la sélection d'espèces végétales adaptées aux spécificités du substrat (carences en nutriments, phénomènes de compaction).

Dans le cadre de la phytoremédiation de sols dégradés tels que les sols de friches contaminés en HAP ou les parcs à cendres, le choix du végétal s'est arrêté sur *Miscanthus x giganteus* (MxG). Cette plante en C<sub>4</sub> originaire d'Asie et peu exigeante quant à la qualité de sols, a en effet été mise en culture avec succès sur divers substrats contaminés en éléments traces métalliques (cadmium, chrome, etc) ainsi qu'au niveau d'une ancienne station de lavage de charbon (région Lorraine, Moselle-Est) à faible valeur agronomique (remblais de démolition). Il s'agit d'une graminée pérenne offrant une récolte annuelle reproductible et des possibilités de revalorisation de la biomasse. Son efficacité photosynthétique ainsi que son réseau racinaire très développé suggèrent une exsudation importante ainsi qu'une surface d'échange plante-bactéries-sol et un turn-over racinaire favorables au développement des communautés microbiennes et des interactions plante-sol-(polluants)-bactéries.

C'est pourquoi l'objectif principal de ce travail de thèse est d'avoir une vue globale de la bioremédiation des sols dégradés, sous l'effet de la culture de *Miscanthus x giganteus*. Pour cela, deux catégories de sols aux caractéristiques physico-chimiques et biologiques contrastées ont été choisies : des sols de friche industrielle pollués (essentiellement en HAP et en métaux) et des cendres volantes non polluées mais à faible potentiel agronomique (en tant que substrat unique de croissance pour le végétal). Le présent travail se décline en quatre parties visant à :

- identifier dans les exsudats racinaires de MxG, les molécules susceptibles d'influencer la biodégradation des HAP par co-métabolisme, et étudier l'influence du processus (co-métabolisme exsudats-HAP) dans la biostimulation de cultures mixtes bactériennes dégradantes,

- caractériser « l'effet rhizosphérique » de MxG sur les communautés bactériennes (densité et diversité), l'accent étant mis sur celles à capacité de dégradation des HAP, au niveau rhizosphérique,
- évaluer la dissipation des HAP sous l'effet de la culture de MxG,
- étudier les possibilités de réhabilitation de sols à travers la production de biomasse végétale et l'impact sur la qualité des sols.

Ce travail repose ainsi sur deux aspects complémentaires : un aspect fondamental relatif à l'étude des interactions « exsudats racinaires – bactéries » dans le cadre de la rhizoremédiation des HAP et un aspect appliqué portant sur la réhabilitation de sols dégradés, comprenant l'instauration d'une phase exploratoire *in situ* (suivi de l'installation des cultures).

## II. MATERIELS ET METHODES

Les travaux réalisés reposent à la fois sur l'étude des processus de rhizodégradation des HAP associés à la phytoremédiation des sols de friche pollués et de la revégétalisation des cendres volantes permettant également, à long-terme, la phytostabilisation du matériau et la réhabilitation du site (Figure 16).

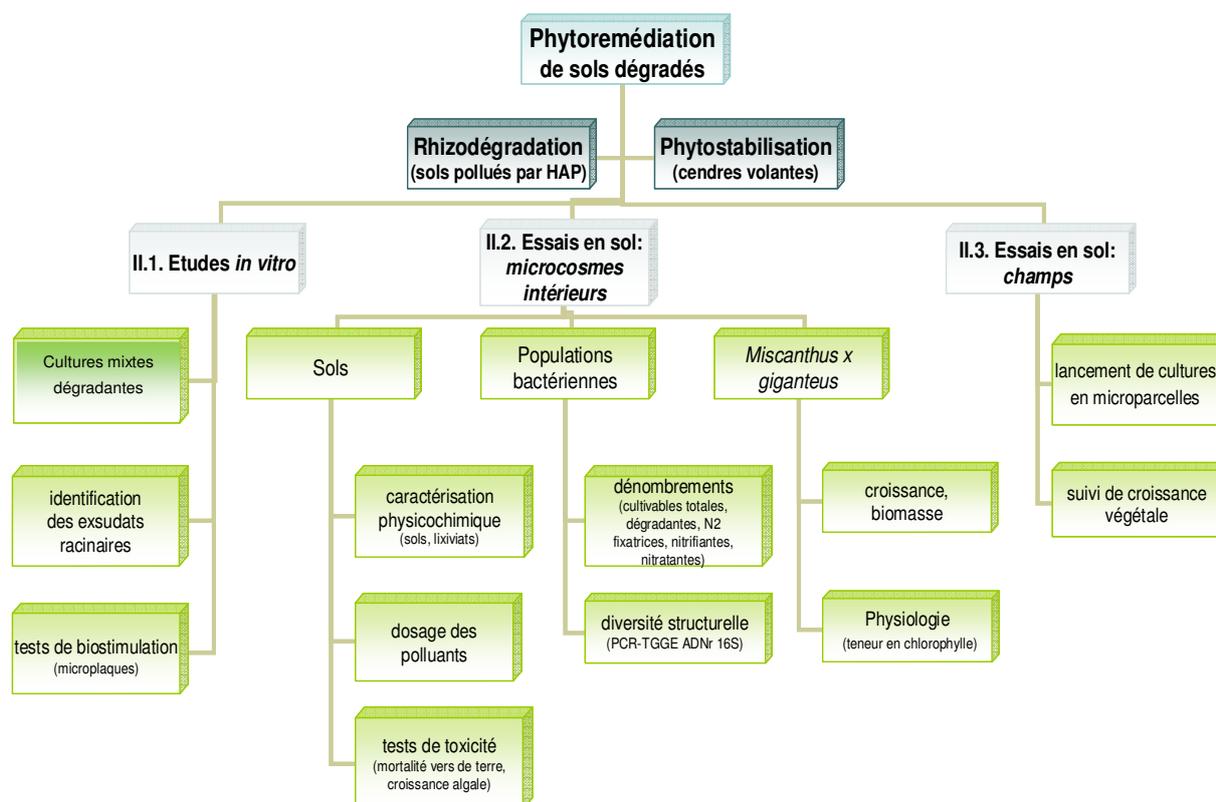


Figure 16 : Plan d'expérience général.

Ces deux axes de recherche s'articulent autour :

- **d'une phase d'étude *in vitro*** (Figure 16) portant sur la collecte et l'identification au sein des exsudats racinaires des classes majeures de molécules (acides aminés, sucres et acides organiques) ainsi que celle des métabolites secondaires, potentiellement inductibles de voies de biodégradation des HAP par co-métabolisme. La caractérisation de cultures bactériennes mixtes à capacité de dégradation des HAP, suivi du développement de tests en microplaques portant sur leur « biostimulation » en présence des exsudats racinaires de MxG

(et de certains métabolites secondaires identifiés), ont été menés par la suite (Técher et al., 2011).

- **d'une phase d'essais en microcosmes** (Figure 16) centrée sur l'étude de la croissance de la plante en conditions contrôlées (taille, biomasse, teneurs en pigments chlorophylliens). L'impact global sur les différents substrats a été analysé (devenir des polluants HAP/apports en matière organique/effets sur les nutriments du sol tels que l'azote, le phosphore et le potassium). Enfin, la caractérisation et le suivi de la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques ont été réalisés conjointement. Préalablement à l'analyse de la diversité bactérienne par méthode PCR-TTGE (ADNr 16S) (Muyzer et al., 1993), une méthode d'extraction-purification d'ADN de sols applicable aux sols de friche étudiés, a été mise au point (Técher et al., 2010; Técher et al., 2012a et b).

- **d'une phase d'essais en champs** (Figure 16) consistant en la mise en place de micro-parcelles de culture et le suivi de la croissance de MxG (Técher et al., 2010; Técher et al., 2012b).

Le matériel et les méthodes utilisées sont décrits en fonction des trois composantes essentielles : la plante *Miscanthus x giganteus*, les sols de friche à réhabiliter et les bactéries du sol toutes ces composantes étant en interaction les unes avec les autres.

## **II.1. La plante : *Miscanthus x giganteus***

### **II.1.1. Sécrétions racinaires**

L'identification des molécules impliquées dans les phénomènes de bioaugmentation bactérienne et d'interactions non spécifiques (sucres, acides aminés, acides organiques et polyphénoliques) s'inscrit dans un programme de recherche mené en collaboration avec le « Department of Chemistry and Biochemistry and Department of Geology and Pedology, Mendel University of Agriculture and Forestry (MUAF), Brno, Czech Republic » et le Laboratoire de Chimie et de Méthodologies pour l'Environnement (LCME- Metz, France).

### ***II.1.1.1. Etude préliminaire des produits rhizosphériques***

#### ***II.1.1.1.1. Méthode de collecte***

Des essais préliminaires de collecte des produits rhizosphériques et de tests en microplaques ont été menés pour vérifier la présence de composés capables de promouvoir de manière non spécifique le développement des populations microbiennes dans la rhizosphère de MxG (sucres, acides aminés, acides organiques).

La méthode de collecte utilisée consiste en l'excavation d'une portion rhizosphérique de sol agricole cultivé avec MxG (collaboration avec le lycée public agricole de Metz - Courcelles Chaussy 57). Les racines sont récupérées, secouées énergiquement afin d'enlever les macro-agrégats de terre et rincées à l'eau avant immersion durant 2 heures dans de l'eau distillée. La solution est mise à décanter pendant 30 min, filtrée (0,45 µm) et congelée pour lyophilisation.

#### ***II.1.1.1.2. Identification des acides aminés***

L'identification des acides aminés, potentiellement impliqués dans le chimiotactisme et les phénomènes de répression catabolique des composés aromatiques (Karlovsky et al., 2008; Rojo, 2010), a été réalisée à partir des produits rhizosphériques. Les extraits lyophilisés sont dissous (protonation) dans une solution d'acide chlorhydrique à 0,1M (500 mL) et filtrés (membrane en nylon 0,45 mm, Chromatography Research Supplies, Adison, USA). Les concentrations en acides aminés sont déterminées par chromatographie liquide haute performance (HPLC modèle HP 1100 liquid chromatograph Hewlett Packard, Wilmington, DE, USA) couplée à un détecteur fluorimétrique (FLD HP 1100). Une dérivation préalable de la colonne de chromatographie est réalisée avec du o-phthalaldehyde (OPA) (Formánek et al., 2005). Les lectures se font à 450 nm (excitation à 340 nm) après passage dans une colonne de type Zorbax Exlipse AAA Rapid Resolution (Agilent Technologies, USA). Un gradient linéaire de 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,8 (solvant A) et acétonitrile=méthanol=eau 45 :45 :10 (v/v) (solvant B) est appliqué, à un débit de 2 mL/min. La procédure est la suivante : 0% B (1,9 min), 0–57% B (16,2 min), 57–100% B (0,7 min), 100% B (3,5 min), 100–0% B (0,9 min) et 0% B (2,8 min). La colonne de chromatographie est équilibrée pendant 5 min aux conditions initiales avant toute injection et maintenue à une température de 40°C.

Dans le cadre de la collaboration avec l'Université Mendel de Berne (MUAF), la composition en acides aminés obtenue sera comparée à celle issue d'exsudats racinaires de MxG extraits dans 0,01 M CaSO<sub>4</sub>. Cette dernière méthode de collecte permet une estimation

supplémentaire de la quantité effectivement exsudée par les racines en un temps donné (2 h). En effet, l'emploi de d'une solution de CaSO<sub>4</sub> permet de simuler les conditions de pression osmotique régnant dans les sols (Cakmak et al., 1988).

#### ***II.1.1.1.3. Identification des sucres***

Les sucres ont également été identifiés à partir de la fraction d'exsudats extraite dans 0,01 M CaSO<sub>4</sub> par méthode de chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) (Katona et al., 1999) et serviront de support supplémentaire à l'interprétation des résultats. Brièvement, les exsudats sont homogénéisés dans 500 µL de pyridine (contenant 2,5 g hydroxylamine hydrochloride/100 mL) et chauffé à 70°C durant 30 min. On procède ensuite à la transformation des sucres en leurs oximes (C=NOH) et dérivés silylés (C-O-Si-) avec ajout de 1 mL de d'hexamethyldisiloxane (HDMS) et 100 µL d'acide trifluoroacetic (TFA), l'ensemble porté à 100°C durant 1h. Les solutions sont alors prêtes pour injection (1µL) en GC-MS (Saturn II GC-MS system Varian) d'après les spécifications techniques décrites par Katona et ses collaborateurs (1999).

#### ***II.1.1.1.4. Identification des acides organiques***

Dans le cadre de ce travail portant sur la rhizodégradation des HAP, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la fraction aromatique des produits rhizosphériques de MxG, pouvant jouer le rôle de co-métabolites de dégradation bactérienne du fait de leurs similitudes structurales avec les HAP (Shaw et al., 2006; Singer et al., 2003). La composition en acides organiques de type phénols dérivés de la lignine a ainsi été déterminée par HPLC (Formánek et al., 2005).

#### ***II.1.1.2. Etude des exsudats racinaires : identification des métabolites secondaires***

Afin de disposer d'un support mieux maîtrisé dans la compréhension des mécanismes pouvant favoriser la biostimulation de la dégradation des HAP, la méthode de culture des plants de MxG a été modifiée (ci-après), favorisant la production de métabolites secondaires au niveau racinaire.

### ***II.1.1.2.1. Production et collecte des exsudats***

Les rhizomes de MxG (préalablement nettoyés, stérilisés à l'eau de javel et abondamment rincés) ont été mis en culture dans du sable de quartz durant trois mois afin de stimuler la production de métabolites secondaires (D'Arcy, 1982; Lattanzio et al., 2009). Les racines ont ensuite été récupérées et extraites à l'eau distillée durant 2 h, puis le filtrat a été lyophilisé pour analyse.

### ***II.1.1.2.2. Identification des métabolites secondaires***

60 mg d'exsudats racinaires lyophilisés sont repris dans 2 mL de solvant (80% méthanol/ 20% eau), agités durant 30 min, centrifugés à 700 g et filtrés (PTFE 0,45 µm) avant injection. L'analyse par HPLC est réalisée avec un appareil équipé d'un détecteur UV visible Waters et d'une colonne RP-C18 Alltech Intertsil ODS – 5 µm x 4,6 mm 150 mm. Le débit utilisé est de 1 mL / min à température ambiante. Un gradient de 3 phases mobiles est utilisé : A : 50 mM phosphate d'ammonium (pH 2,6); B : acétonitrile / solvant A (80/20 (V/V)) et C : acide phosphorique 200 mM (pH 1,5). Les solvants sont préalablement filtrés (Whatman Maidstone England n° 3) et soniqués durant 25 min. Le profil de gradient utilisé est le suivant : 100% A à t<sub>0</sub>, 92% A / 8% B pendant 4 min, 14% B / 86% C à 10 min, 16% B / 84% C à 22,5 min, 25% B / 75% C à 27,5 min, 80% B / 20% C à 50 min, 100% A à 55 min. Le système est reconditionné pendant 10 min (100% A) entre chaque injection. 20 µL d'échantillon sont injectés. Des solutions standards de composés phénoliques (1 mg/mL) sont utilisées comme référence : catéchine, épicatechine, acide gallique, acide caféique, acide chlorogénique, orientine, homoorientine, isovitexine, vitexine, malvidine, colchicine, acide cinnamique, rutine, quercétine, acide *p*-coumarique (Across organics France). Les molécules contenues dans les exsudats racinaires sont identifiées en comparant leur spectre UV-visible et leur temps de rétention à ceux des étalons injectés. Leur quantification est réalisée par mesures d'absorbance à 280 et à 320 nm (Nsemi Muanda et al., 2010).

## ***II.1.2. Cultures en microcosmes***

### ***II.1.2.1. Préparation des rhizomes***

Des rhizomes issus de plantes « mères » de MxG prélevées en champ (collaboration avec le lycée public agricole de Metz Courcelles-Chaussy (57)) sont nettoyés et rincés à l'eau courante, avant d'être immergés 10 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% (Ebrahim & Mohsen, 2004). Ils sont rincés par 7 lavages successifs avec de l'eau

préalablement stérilisée par autoclavage puis recouverts par une couche de sable de quartz de 1 cm afin de maintenir un niveau d'humidité favorable à la germination en étuve phytotronique (photopériode 16h/8h, 24 °C, 95 % humidité relative; CONVIRON CMP4030). L'apport en eau régulièrement contrôlé durant cette période, permet de s'assurer de la viabilité des rhizomes avant la mise en culture. Par ailleurs, une partie des nutriments mis en réserve dans les rhizomes, sont utilisés lors des premiers stades de germination précédant la mise en terre. La sélection de lots d'individus considérés comme « homogènes » dans les différents sols (au bout de 3 semaines de germination) se fait ensuite par le choix de plantes de tailles similaires (de l'ordre du décimètre).

### ***II.1.2.2. Conditions de culture***

L'éclairage est assuré par des néons de culture végétale émettant particulièrement dans le spectre d'absorption des pigments chlorophylliens (lumière bleue 400-520 nm et rouge 600-720 nm; OSRAM Fluora L36W/77). Des « vases de cultures » ont été fabriqués à partir de portions de tuyau en PVC d'une hauteur de 20 cm fermé dans le fond par un double grillage assurant drainage et aération. Cela afin de favoriser une croissance des racines dans toute la hauteur de la colonne de sol plutôt que dans un plan horizontal, et vérifier par là-même la pénétration des racines en profondeur dans les sols malgré d'éventuels effets de compaction des substrats (en particulier pour les cendres volantes). L'apport en eau est maintenu à 70% de la capacité de rétention d'eau des différents sols.

### ***II.1.2.3. Paramètres physiologiques mesurés***

#### ***II.1.2.3.1. Croissance et biomasse***

La hauteur des plantes au dernier entrenœud est mesurée au millimètre près chaque semaine dès la mise en terre des rhizomes ayant germé. Les plantes sont sacrifiées et analysées en séparant les tiges et les feuilles au niveau des parties aériennes ainsi que les rhizomes et les racines au niveau des parties souterraines. Pour chaque individu, la masse de matière végétale fraîche (g) puis sèche (séchage 48h à 105°C; MEMMERT Modèle 800) est relevée (Lewandowski, 1998).

#### ***II.1.2.3.2. Teneur en pigments chlorophylliens***

La feuille néoformée de chaque plante est prélevée, afin d'éviter d'éventuels « artefacts » liés aux phénomènes naturels de sénescence des feuilles. Elle est grossièrement

découpée et immédiatement congelée dans l'azote liquide puis stockée jusqu'à analyse. 80 mg de feuilles sont alors pesés et finement découpés (ciseaux désinfectés à l'alcool 70%), ajoutés à 500 mg de microbilles en verre (BioSpec; diamètre 0,1 mm, autoclavées) et 750 µL de diméthylformamide (DMF) sont ajoutés dans un tube Eppendorf de 2 mL (autoclavé). Un premier broyage manuel est effectué à l'aide d'une tige en verre, durant 5 min. 1 mL de DMF est rajouté, puis l'ensemble est vortexé et centrifugé à 12000 g pendant 90 s. Le surnageant est transféré dans un tube Falcon de 15 mL. Les tissus culottés sont à nouveau broyés durant 3 min (sans ajout de solvant). Puis 1 mL DMF est ajouté et le tube vortexé et centrifugé à 12000 g durant 90 s; le surnageant obtenu complète le surnageant précédent. L'opération est répétée une fois supplémentaire. Le maximum de pigments chlorophylliens est récupéré grâce à 2 lavages additionnels par ajout de 1 mL de DMF à chaque fois. Les tubes Falcon contenant les extraits chlorophylliens sont centrifugés 5 min à 3000 g. Les extraits sont directement prélevés pour les dosages spectrophotométriques de fractions de 200 µL en microplaques (n = 4 / échantillon de feuille broyé) ( $A_{647\text{nm}}$  et  $A_{664\text{nm}}$ ). La prise en compte de la longueur moyenne du trajet optique dans un puits de la microplaque a été incluse dans les calculs à l'issue des mesures d'absorbance. Les teneurs en chlorophylles (mg/L) sont calculées d'après les formules suivantes (Inskip et al., 1985) :

- chlorophylle a :  $12,7 * A_{664} - 2,79 * A_{647}$
- chlorophylle b :  $20,7 * A_{647} - 4,62 * A_{664}$
- chlorophylles totales :  $17,9 * A_{647} + 8,08 * A_{664}$ .

### ***II.1.3. Cultures en champs***

Des plantations *in situ* sont réalisées au sein de micro-parcelles à partir desquelles sont effectuées les prélèvements de sols (pollués/cendres) servant aux essais en microcosmes. Ces essais de culture en champs, replacés dans le contexte du « cycle de vie » d'une plantation de MxG (allant jusqu'à 20 ans), correspondent à la phase initiale d'installation des rhizomes (Lewandowski et al., 2000).

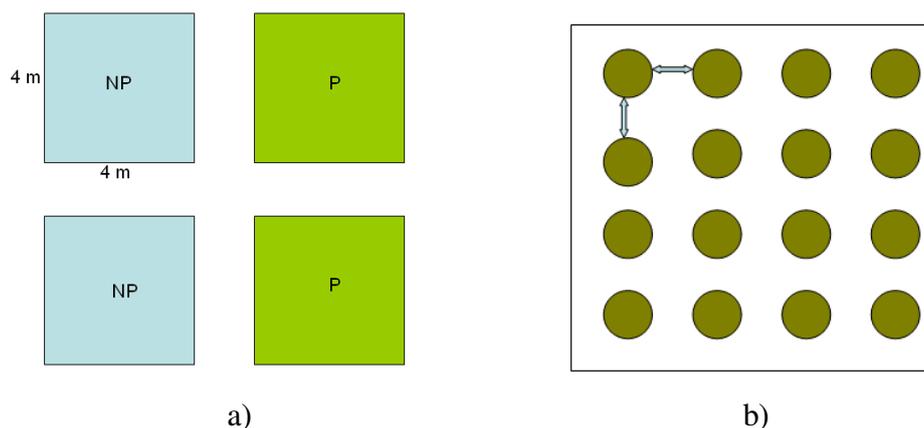
#### ***II.1.3.1. Plantation en sols de friche contaminés***

La préparation des parcelles et la mise en terre de rhizomes ont été effectuées en sols de friche (dans la semaine du 23 novembre 2008) afin d'avoir la 1<sup>ère</sup> saison de germination au printemps 2009 (Figure 17).



**Figure 17 : Désherbage manuel et délimitation des micro-parcelles en sols de friche contaminés.**

Deux zones caractérisées par une pollution majoritaire en HAP d'une part (phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène) et quelques métaux (cuivre, zinc, plomb) et par une pollution multiple d'autre part (pyrène essentiellement pour les HAP; chrome, cuivre, nickel, zinc, plomb pour les métaux; cyanures) ont été retenues (d'après une évaluation simplifiée des risques communiquée par le gestionnaire du site). L'historique de ces deux zones, respectivement dénommées H2 et M2, est décrit en § III.2.1.1.



**Figure 18 : Agencement des parcelles sur site contaminé : a) à l'échelle du site : 4 parcelles de 16m<sup>2</sup> réparties en 2 lots avec une modalité plantée (P) et une modalité non-plantée (NP) à chaque fois; b) à l'échelle d'une parcelle : 4 rangées espacées de 80 cm, chaque rangée comprenant 4 rhizomes espacés de 80 cm.**

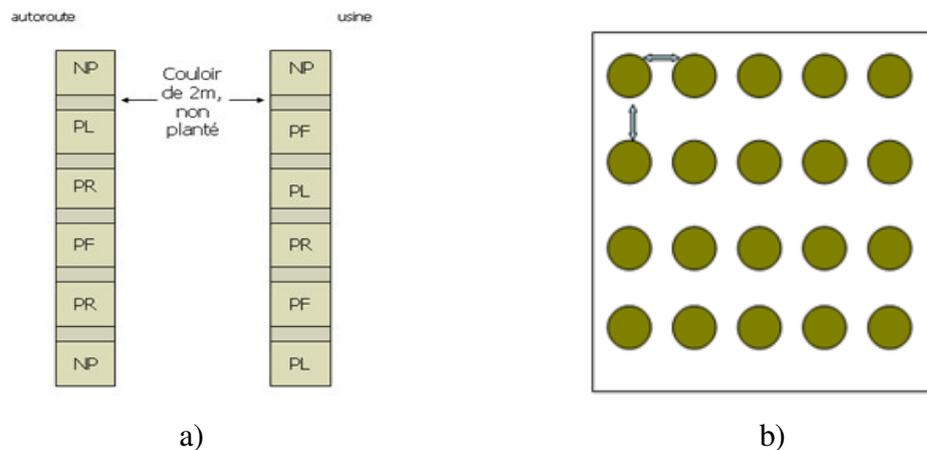
Au final, 16 rhizomes sont plantés par parcelle de 16 m<sup>2</sup> (4 X 4 m), soit une densité de 1 rhizome/m<sup>2</sup> (Figure 18).

### II.1.3.2. *Plantation dans le parc à cendres*

La plantation dans le parc à cendres a débuté le 21 mai 2008, en collaboration avec le lycée agricole de Courcelles–Chaussy. Trois modalités de culture ont été retenues, ainsi qu'une modalité témoin (Figure 19) :

- planté, laissé sur pied
- planté, fauché
- planté, fauché et récolté
- non planté (témoin).

Les essais sont conduits en triplicats pour chaque modalité, répartis en neuf parcelles plantées et trois parcelles témoins (laissées en l'état) (Figure 19).



**Figure 19 : Agencement des parcelles dans le parc à cendres :** a) à l'échelle du site : NP : non planté; PF : planté fauché (non récolté); PR : planté récolté; PL : planté laissé sur pied; b) à l'échelle d'une parcelle plantée : 4 rangées espacées de 80 cm, chaque rangée comprenant 5 rhizomes espacés de 80 cm, soit 20 rhizomes par parcelle de 16m<sup>2</sup> pour une densité finale de 1,25 rhizome/m<sup>2</sup>).

Un total de 185 rhizomes de MxG a initialement été mis en terre, répartis dans chacune des parcelles plantées selon une densité de 1,25 rhizome/m<sup>2</sup> (Figure 19). Suite au broutage des pousses par des lapins et chevreuils, l'ensemble des rhizomes a été replanté sans distinction de parcelle. L'influence d'amendement de surface (en terre de remblais) sur la croissance des plantes a été étudiée sur deux parcelles de 16 m<sup>2</sup>.

Les mesures réalisées, à la fois en sols de friche contaminés et au niveau du parc à cendres, portent pour cette phase de lancement des cultures, sur la viabilité des rhizomes (nombre d'unité ayant germé), le nombre de pousse par rhizome, la taille des tiges au dernier entre-nœud et l'aspect des plantes.

## **II.2. Les sols de friche et sols de « référence »**

Afin de mieux appréhender le devenir des HAP dans les sols contaminés et l'impact de la culture de MxG à la fois sur les nutriments du sol, les polluants et les communautés bactériennes, trois plans d'expériences ont été réalisés en microcosmes selon différentes modalités (Tableau 8) :

- PE1 : 1<sup>ère</sup> série de culture réalisée selon un plan d'expérience factoriel complet portant sur un sol standard commercial A3. Un sol de friche « fraîchement » pollué a été reconstitué à partir du sol A3, selon 3 modalités : présence/absence HAP (phénanthrène et pyrène à 100 mg/kg sol sec chacun), présence/absence bactéries dégradantes, présence/absence MxG.
- PE2 : 2<sup>ième</sup> série d'essais portant sur la culture de MxG en sol de friche prélevée dans une zone à contamination élevée en HAP (d'après une ESR du site (évaluation simplifiée des risques) réalisée en 2005 (Annexe 6), dénommé H1.
- PE3 : 3<sup>ième</sup> série d'essais reposant sur la culture de MxG, lancée en sols de friche témoignant de degrés de contamination en HAP et métaux variés, dénommés respectivement H2 (contamination majoritaire en HAP, présence de métaux) et M2 (contamination diffuse en HAP et présence majoritaire de métaux et cyanures), d'après l'ESR de 2005 du site (Annexe 6, Tableau 27). Parallèlement à ces essais, des cultures ont également été réalisées dans les cendres volantes, substrat non pollué mais de faible qualité agronomique, récalcitrant au développement des végétaux. La croissance de MxG dans ces différents sols a donc été comparée à celle obtenue en sol de « référence » reconstitué d'après la norme ISO 11269-2.

Les sols des pots non plantés et plantés sont récupérés dans chacun des microcosmes à la fin des essais en prenant soin d'homogénéiser la fraction totale de sol avant prélèvement d'échantillons. Ces derniers sont analysés dans les deux jours qui suivent au maximum pour les dénombrements bactériens (sol rhizosphérique ou non), ou stockés directement à -20°C pour les analyses moléculaires (extraction d'ADN – PCR-TTGE), ainsi que pour les analyses de sols (fractions de nutriments hydrosolubles).

L'historique, la caractérisation physico-chimique et écotoxicologique de l'ensemble des sols sont exposés dans la suite de ce chapitre.

Plans d'expérience (durée)	Sols	Modalités (nombre de réplicats par facteur)	Paramètres mesurés						
			Sols			Populations bactériennes		MxG	
			Analyse des lixiviats	Dosage des HAP	Tests de toxicité	Dénombrements bactériens	Analyse de diversité (ADNr 16S)	Croissance et biomasse	Teneur en chlorophylle
PE1 (3 mois)	A3 (sol standard commercial)	3 modalités : présence/absence de : HAP; bactéries dégradantes; MxG (n = 4)	-	X	-	- cultivables totales - HAP-Dégradantes	Sols rhizosphériques et non plantés	-	-
PE2 (3 mois)	H1 (friche)	1 modalité : planté vs non planté (n = 4)	X	X	croissance algale <sup>a</sup>	- cultivables totales - HAP-dégradantes	Sols rhizosphériques et non plantés	-	-
PE3 (4,5 mois)	H2 (friche)	1 modalité : planté vs non planté (n = 5)	X	X	mortalité vers de terre <sup>b</sup> croissance algale <sup>a</sup>	- cultivables totales - HAP-dégradantes - N <sub>2</sub> fixatrices <sup>c</sup> , AOB <sup>d</sup>	Sols rhizosphériques, rhizoplans et non plantés	X	X
PE3 (4,5 mois)	M2 (friche)	1 modalité : planté vs non planté (n = 5)	X	X	mortalité vers de terre <sup>b</sup> croissance algale <sup>a</sup>	- cultivables totales - HAP-dégradantes - N <sub>2</sub> fixatrices <sup>c</sup> , AOB <sup>d</sup>	Sols rhizosphériques, rhizoplans et non plantés	X	X
PE3 (4,5 mois)	Cendres volantes	1 modalité : planté vs non planté (n = 4)	X	vérification d'absence de contamination	croissance algale <sup>a</sup>	- cultivables totales - HAP-dégradantes - N <sub>2</sub> fixatrices <sup>c</sup> , AOB <sup>d</sup> , NOB <sup>e</sup>	Sols rhizosphériques, rhizoplans et non plantés	X	X
PE3 (4,5 mois)	« référence » (A3 modifié selon norme ISO 11269-2)	Témoin positif de croissance de MxG en sol de « référence », non pollué (n = 4)	X	vérification d'absence de contamination	mortalité vers de terre <sup>b</sup> croissance algale <sup>a</sup>	- cultivables totales - HAP-dégradantes - N <sub>2</sub> fixatrices <sup>c</sup> , AOB <sup>d</sup> , NOB <sup>e</sup>	Sols rhizosphériques, rhizoplans et non plantés	X	X

<sup>a</sup> : test de toxicité chronique, inhibition de croissance algale (*Pseudokirchneriella subcapitata*) réalisé sur les lixiviats de sols avant et après culture.

<sup>b</sup> : test toxicité aiguë, mortalité des vers de terre (*Eisenia fetida*) réalisé dans le cadre d'une évaluation initiale de la toxicité des sols.

<sup>c</sup> : bactéries cultivables fixatrices d'azote moléculaire (N<sub>2</sub>) ou azotofixatrices (d'après Rennie & Kemp, 1981)

<sup>d</sup> : bactéries cultivables oxydant l'ammonium (AOB) (d'après Lipponen et al., 2004)

<sup>e</sup> : bactéries cultivables oxydant les nitrites (NOB) (d'après Muratova et al., 2003)

**Tableau 8 : Récapitulatif des cultures réalisées en microcosmes et des paramètres mesurés.**

## ***II.2.1. Historique***

### ***II.2.1.1. Sols de friche contaminés en HAP et en métaux***

Les échantillons de sol ont été prélevés au niveau d'une ancienne cokerie située dans le nord-est de la France. Le fonctionnement de l'installation jusqu'en 1974 (cokéfaction, usines à gaz) a entraîné des contaminations du sol en HAP, en métaux, en phénols et en cyanures. L'ensemble de la surface (environ 11 ha) est recouverte de débris de matériaux, de laitiers<sup>4</sup> et de terres partiellement végétalisées (colonisation naturelle). Un diagnostic approfondi des sols de surface et une ESR conduits en février 2005 ont mis en évidence des zones contaminées présentant des teneurs en HAP et métaux supérieures aux VDSS (Valeur de Définition de Source Sol) (BASOL, 2008). Les parcelles délimitées pour les essais en champs et le prélèvement des échantillons de sol se situent sur deux zones au profil de contamination multiple. La première zone, impactée par le traitement des goudrons, est contaminée essentiellement par les HAP (phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène) et quelques métaux (cuivre, zinc, plomb) (Tableaux 15 et 27). Deux séries de prélèvements ont été effectuées dans cette zone, en juin 2007 et en novembre 2008, respectivement identifiées par la suite en « H1 » et « H2 » pour les essais en microcosmes. La deuxième zone, de traitement des gaz et de déchargement du coke, présente une contamination par les HAP (pyrène essentiellement), métaux (chrome total, cuivre, nickel, zinc, plomb) et cyanures (Tableau 27 Annexe 6). Une série de prélèvements a été effectuée dans cette zone, en même temps que « H2 » en novembre 2008 et qui sera identifiée comme « M2 ».

### ***II.2.1.2. Parc à cendres***

La centrale thermique d'EDF basée à Richemont (57270) a été créée au début des années 1950 en vue de valoriser les excédents de gaz de hauts fourneaux et d'aciérie produits par les usines de Patural, de Rombas et de Serémange. Depuis leur création et ce jusqu'en 1995, du charbon pulvérisé, essentiellement lorrain, a été utilisé comme combustible

---

<sup>4</sup> dans la métallurgie, résidu issu de la fabrication de la fonte au haut fourneau contenant des oxydes métalliques, essentiellement des silicates, des aluminates et de la chaux, qui sont formés en cours de fusion ou d'élaboration de métaux par voie liquide. Le laitier correspond à la gangue du minerai de fer, isolée de la fonte liquide où il flotte alors par différence de densité (Afechkar & Nahhass, 2005).

complémentaire, entraînant la production d'une quantité importante de cendres. Dès les années 1960, ces cendres furent stockées par voie hydraulique dans 3 bassins de décantation situés au nord-ouest de l'usine. A partir des années 1970, une partie des chaudières a également été alimentée par du fioul lourd. Le stock de cendres entreposé sur le site de Richemont était estimé en 2003 à plus de 250 000 t (Haber et al., 2003). Le site est actuellement en démantèlement (BASOL, 2008).

## ***II.2.2. Echantillonnage, collecte et préparation des sols***

### ***II.2.2.1. Sols de friche***

L'échantillonnage et la collecte de fractions représentatives des sols de friche ont été réalisés, selon la norme française (NF X 31-100, 1992). Les différentes parcelles constituant les essais en champ ont été délimitées en tenant compte de l'homogénéité du lieu (couleur, aspect végétatif, « relief »). 8 à 16 prélèvements élémentaires par type de sol ont été réalisés, à une profondeur de 15 cm environ (profondeur de plantation des rhizomes). Aucune stratification des horizons n'a été observée lors de la collecte des échantillons : les prélèvements sont composés d'un horizon unique. Ces prélèvements élémentaires ont été immédiatement entreposés dans un sac en plastique sombre fermé. Un échantillon global a été préparé au laboratoire à partir de ces échantillons élémentaires selon la norme avant d'être séché, tamisé à 2 mm puis utilisé pour les analyses de sol et les essais en microcosmes.

### ***II.2.2.2. Sols de « référence »***

#### ***II.2.2.2.1. Sol standard A3***

##### **Caractéristiques physico-chimiques**

Le sol standard A3, utilisé dans le plan d'expérience 1 (PE1) est un sol commercial reconstitué (A3 LUFA, Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer, Allemagne, 2006) dont les caractéristiques sont données dans le Tableau 9.

**Tableau 9 : Caractéristiques physico-chimiques du sol standard A3 (LUFÄ, Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer, Allemagne, 2006).**

Classes de taille des particules (mm)	<0.002 (Argiles)	0.002 - 0.05 (Limon fin)	0.05 - 2.0 (Limon grossier - sable)	Type de sol
Sol standard A3 (%)	18.0 ± 1,5	35,5 ± 2.2	46.5 ± 3.3	Terre grasse (limono-argileux)

Carbone organique (%)	Particules < 0.02 mm (%)	pH (0.01 M CaCl <sub>2</sub> )	Capacité d'échange cationique (mval / 100g)	Capacité de rétention d'eau (g/100g)	Poids par volume (g/1000mL)
2.19 ± 0.08	37,3 ± 3.5	7.2 ± 0.1	19 ± 5	49.6 ± 5.3	1120 ± 84

### Préparation aux essais en microcosmes : contamination en HAP

Une fraction du sol A3, soit 500 g de sol (5 %), est contaminée par du pyrène et du phénanthrène. Pour cela, 1,6 g de chaque molécule sont dissous dans 15 mL de diméthylformamide (DMF, permettant la solubilisation d'une quantité de HAP plus importante que l'hexane). Le sol est homogénéisé à l'aide d'une baguette en verre et le solvant évaporé à l'obscurité durant 12 h sous hotte aspirante. Cette fraction contaminée est ensuite mélangée à 8,5 kg de sol A3 pour une concentration finale théorique de 100 mg/kg de sol sec et répartie dans les pots.

#### **II.2.2.2. Sol de « référence » (d'après la norme ISO 11269-2)**

Ce sol est issu du sol A3, modifié préalablement aux essais en microcosmes pour le plan d'expérience PE3 (annexe 5). Brièvement, 500 g de sphaigne sont séchés puis broyés et tamisés à 2 mm (broyeur RETSCH RM100). On procède ensuite au mélange avec 8,5 kg de sable de quartz (préalablement lavé à l'acide chlorhydrique 1M) et 11 kg de sol standard A3. Ce sol permettant un développement optimal de MxG, sera utilisé comme substrat de référence afin de comparer les croissances obtenues dans les sols de friche pollués H2 et M2 d'une part et dans les cendres volantes non polluées mais récalcitrantes au développement végétal d'autre part, à celle obtenue dans ce sol de « référence ». Les caractéristiques physico-chimiques (texture et carbone organique total), se rapprochent dans sa composition du sol de norme ISO 11269-2, spécifié dans les tests de toxicité : 70 % sable, 10 % sphaigne, 20 % kaolinite.

### ***II.2.3. Caractérisation physico-chimique***

La détermination des caractéristiques physico-chimiques d'un sol permet d'estimer le niveau de fertilité minérale pour une culture donnée (Schindelbeck et al., 2008). Dans le cadre des sols de friches industrielles, l'évaluation du degré de pollution (micropolluants organiques et minéraux) permet de mieux appréhender l'impact des contaminants sur la qualité générale de ce sol (Margesin et al., 2000; Schindelbeck et al., 2008). Par ailleurs, les processus de phytoremédiation sont des phénomènes complexes résultant des interactions entre sol, plantes, polluants et microorganismes (Gerhardt et al., 2009; Kamath et al., 2004). Des phénomènes de compétition entre plantes et microorganismes vis-à-vis de l'utilisation de nutriments (azote, phosphore, potassium) sont accentués durant les processus de bioremédiation et de croissance de la plante, (Joner et al., 2002; Lewis et al., 1986; Manilal & Alexander, 1991; Margesin et al., 2000; Sabaté et al., 2004). La connaissance des déterminants principaux du sol (texture, pH, teneurs en nutriments) apparaît d'autant plus fondamentale que le sol est le support direct de ces interactions, influençant à la fois le développement des populations bactériennes, des plantes, la biodisponibilité et le devenir *in fine* des contaminants (Andreoni et al., 2004; Kamath et al., 2004; Sabaté et al., 2004).

La caractérisation initiale de l'ensemble des sols utilisés pour les essais en microcosmes, *i.e.* sol standard A3, sol de « référence » (A3 modifié), cendres volantes, sols de friche contaminés H1, H2 et M2 a d'abord été effectuée. Les fractions hydrosolubles (lixiviation à l'eau ultrapure) ont également été analysés pour leurs teneurs en composés organiques dissous (composés réducteurs) et en nutriments (nitrites, nitrates, phosphates, oxydes de potassium) avant et après culture.

#### ***II.2.3.1. Etat initial : fraction totale des sols***

##### ***II.2.3.1.1. Paramètres mesurés dans les sols***

Les protocoles retenus pour les analyses des sols d'après les différentes normes (Tableau 10) sont détaillés en annexe 5.

**Tableau 10 : Paramètres physico-chimiques et biologiques mesurés pour la caractérisation initiale des sols utilisés en microcosmes.**

	<b>Paramètres mesurés</b>	<b>Processus associés dans le sol</b>	<b>Références</b>
<b>Physiques</b>	Texture et capacité de rétention d'eau	Biodisponibilité de l'eau, des nutriments et micropolluants	Analyse granulométrique par sédimentation, méthode de la pipette (NF X 31-107, AFNOR 1983)
	pH	Toxicité, biodisponibilité de certains nutriments / micropolluants	Détermination du pH (NF ISO 10390, AFNOR, 1994)
<b>Chimiques</b>	Teneur en cations extractibles Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup>	Biodisponibilité en micro et macronutriments, capacité d'échange cationique (CEC) – pouvoir tampon du sol	Détermination des cations extractibles à l'acétate d'ammonium NF (X31-130, 1999)
	Teneur en éléments traces métalliques : cuivre, zinc, cobalt, plomb, cadmium, nickel, chrome	Contenu en éléments traces, toxicité	Extraction des éléments en traces solubles dans l'eau régale (mélange acides nitrique et chlorhydrique concentrés) et dosage des métaux par absorption/émission atomique de flamme (NF ISO 11466, 1995)
	Teneur en matière organique et carbone organique total	Stockage de l'énergie / carbone, rétention d'eau et nutriments pouvant supporter les fonctions biologiques	Dosage du carbone organique total selon méthode ANNE (NF X 31-109, 1993)
	Teneur en azote total	Azote potentiellement minéralisable, macronutriment (plantes et microorganismes)	Dosage de l'azote organique totale par méthode Kjeldahl (NF ISO 11261, 1995)

### **II.2.3.1.2. Extraction et dosage des HAP dans les sols**

Le protocole d'extraction au Soxhlet se base sur la méthode 8310 de l'USEPA. La cartouche d'extraction contient l'échantillon de sol à analyser (tamisé à 2 mm) et du sulfate de sodium, à 5 g chacun. Le sulfate de sodium est utilisé pour réaliser un séchage chimique du sol préalablement à l'extraction. Cette méthode minimise la dégradation de l'échantillon (conservé à -20°C après les essais en microcosmes) et la perte de composés volatiles comme le naphthalène. Le solvant d'extraction est l'hexane (90 mL par échantillon). Le volume d'hexane récupéré après extraction (16 h) est mesuré à l'aide d'une burette graduée. Les

échantillons n'ayant pas nécessité de concentration préalable, 20 µL sont directement injectés en HPLC (WATERS system, colonne uptisphere 5 µm 250\*4,6 mm, INTERCHIM). Les conditions opératoires d'analyses sont les suivantes : phase mobile en gradient d'acétonitrile de 60% à 100% de 2 min à 20 min, puis 100% d'acétonitrile jusqu'à 45 min, à un débit de 1 mL/min à 20°C.

Les teneurs en HAP des différents sols pollués (sol A3 selon les modalités, sols de friche H1, H2, M2) et sols non pollués (sol A3 selon les modalités, cendres volantes et sol de « référence ») sont quantifiées à  $t_0$ . Suite aux essais de culture de MxG en microcosmes, les sols des différents pots sont à nouveau analysés pour leurs concentrations en HAP, d'après le même protocole.

Concernant les essais en microcosmes avec sol A3 artificiellement contaminé en pyrène et phénanthrène (III.3.2.4.), la disparition de ces deux HAP par volatilisation ou lixiviation est très improbable étant donné leur faible pression de vapeur d'une part (respectivement  $6,8 \cdot 10^{-4}$  et  $4,25 \cdot 10^{-6}$  mm Hg (Bojes & Pope, 2007) et l'apport en eau de l'ordre de 70% de la capacité de rétention du sol d'autre part. L'immobilisation de la majeure partie des contaminants due à la formation de résidus non extractibles au cours des essais est également peu probable étant donné les échelles de temps considérées (3 mois pour le PE1 et PE2, 4,5 mois pour les PE2 et PE3, Tableau 7) (MacLeod & Semple, 2000; Nam et al., 1998). La dissipation de ces composés sera donc considérée comme liée à la dégradation dans les conditions expérimentales définies.

### ***II.2.3.2. Analyse des fractions hydrosolubles de sol***

La réhabilitation des sols de friche industrielle repose à la fois sur la pérennité économique des programmes instaurés (par exemple production d'une biomasse revalorisable) et sur les possibilités de restauration des sols traités. Outre les aspects relatifs à la croissance des végétaux et à la dissipation des polluants, l'impact du développement de la rhizosphère sur la qualité des sols sera appréhendé après culture de MxG. Pour cela, le dosage des nutriments directement disponibles dans la fraction hydrosoluble des sols sera effectué après lixiviation des divers substrats. Les paramètres physico-chimiques évalués portent sur le pH, la conductivité et les teneurs en nutriments, limitants à la fois pour la croissance bactérienne et végétale : teneurs en carbone organique, en azote (nitrites, nitrates), phosphate et potassium.

#### **II.2.3.2.1. Préparation des lixiviats**

Les conditions de lixiviation sont les suivantes : agitation continue (2 h), avec un ratio solide:liquide de 1:10 dans de l'eau ultra-pure, à température ambiante (25°C). Après la période de lixiviation de 2 heures, les échantillons sont laissés à décanter pendant 5 min. Les surnageants sont récupérés et centrifugés à 2500 g durant 20 min. Une fraction est directement utilisée pour les tests de croissance algale et une autre fraction est filtrée à 0,45 µm pour l'analyse des composés organiques réducteurs, des ions ammonium, nitrite, et phosphate.

Les conditions de lixiviation diffèrent pour les cendres volantes sujettes aux analyses physico-chimiques. Un ratio solide:liquide de 1:10 dans de l'eau ultra-pure est maintenu mais l'ensemble est chauffé avec agitation régulière à 85°C durant 1 h pour favoriser la récupération des composés organiques solubles.

#### **II.2.3.2.2. Dosage des composés organiques réducteurs**

Le dosage des composés organiques réducteurs est réalisé à l'aide de la méthode mise au point par Kenealy & Jeffries (2003). Les ions  $\text{Cu}^{2+}$  forment des complexes avec les protéines en milieu alcalin avec lesquels l'acide bicinchoninique (SIGMA, B9643) va réagir en prenant une couleur pourpre. Le dosage est réalisé en microplaque, à 35 µL d'échantillon sont ajoutés 150 µL de mélange réactionnel (98 % de solution d'acide bicinchoninique avec 2 % d'une solution de sulfate de cuivre II pentahydraté à 4 % (m/v)). Ce mélange est ensuite incubé 45 min à 80°C avant de mesurer l'absorbance à 562 nm. Afin de déterminer les concentrations en composés organiques réducteurs, une gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide de solutions de glucose de 0 à 5 mg/mL.

#### **II.2.3.2.3. Dosage des ions nitrite**

L'acide sulfanilique forme un composé diazo avec un ion nitrite. L'ajout concomitant de naphthyléthylènediamine produit un complexe rose présentant un maximum d'absorbance à 540 nm. Le dosage est réalisé en microplaque. 40 µL d'une solution de réactif de Griess-Ilosvay (0,8% acide sulphonilique dans 5N acide acétique, 0,5% solution d'acide alpha-naphtylamine dans 5N acide acétique) sont ajoutés dans chaque puits contenant 200 µL de lixiviat. Les mesures d'absorbance sont réalisées à 540 nm après 15 min d'incubation à température ambiante. Afin de déterminer les concentrations en nitrite, une gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide de solutions de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) de 0 à 10 mg/L.

#### ***II.2.3.2.4. Dosage des ions nitrate***

Le dosage est réalisé en microplaque. A 100  $\mu\text{L}$  de lixiviat sont ajoutés 10  $\mu\text{L}$  de salicylate de sodium à 0,5 % P/V. L'ensemble est mis à évaporer à sec durant 2 heures à 80°C. 20  $\mu\text{L}$  d'acide sulfurique concentré sont ajoutés dans chaque puits, suivi d'une incubation 10 min à température ambiante. 150  $\mu\text{L}$  d'eau distillée et 150  $\mu\text{L}$  d'un mélange de soude (40 % P/V) et de bi-tartrate de potassium (6 % P/V) sont successivement ajoutés. Les lectures d'absorbance se font après 15 min d'incubation à température ambiante, à 415 nm. Afin de déterminer les concentrations en ammonium, une gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide de solutions de chlorure d'ammonium ( $\text{NaNO}_3$ ) de 0 à 10 mg/L.

#### ***II.2.3.2.5. Dosage des ions phosphate***

Les ions phosphate réagissent en milieu acide avec le molybdate d'ammonium pour former un complexe phosphomolybdique de couleur bleue, après réduction par l'acide ascorbique. Le dosage est réalisé en microplaque. Le réactif molybdique est d'abord préparé en mélangeant, sur une base d'1 L, 74 mL d'acide sulfurique concentré, 6 g de molybdate d'ammonium dans 125 mL d'eau ultrapure, 0,1455 g de tartrate double d'antimoine et de potassium dans 50 mL d'acide sulfurique 4 N. 1 g d'acide ascorbique est ensuite dissout dans 50 mL de la solution de molybdate ainsi préparée. Une coloration jaune se forme. 40  $\mu\text{L}$  de ce mélange de réactifs est ajouté à 200  $\mu\text{L}$  de lixiviat. L'ensemble est laissé au repos 15 min à température ambiante pour que la coloration bleue, synonyme de la présence d'ions phosphate, se stabilise. Les absorbances sont lues à 720 nm. Afin de déterminer les concentrations en phosphate, une gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide de solutions de phosphate de potassium ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) de 0 à 10 mg/L.

#### ***II.2.3.3. Evaluation écotoxicologique***

La caractérisation écotoxicologique des sols pollués, qui intègre l'impact de l'ensemble des contaminants, constitue un complément nécessaire aux dosages physico-chimiques, en particulier dans le cadre d'une démarche de réhabilitation des sols (Bispo et al., 1999; Le Corfec, 2011; Vasseur & Cossu-Leguille, 2003). La mise en contact directe d'un organisme vivant avec un sol pollué permet en effet de révéler, dans les conditions d'exposition développées, le caractère toxique de ce dernier (Le Corfec, 2011; Vasseur & Cossu-Leguille, 2003). Etant donné la diversité d'espèces et de critères d'effets potentiellement associés à un sol pollué, l'évaluation de la toxicité d'un échantillon de sol suggère de recourir à une batterie d'essais combinant à la fois différentes espèces et critères

d'effets (Bispo et al., 1999; Eom et al., 2007; Le Corfec, 2011). Dans un premier temps, la toxicité des sols de friche à  $t_0$  (caractérisation initiale des sols) a été évaluée vis-à-vis d'individus de vers de fumier *Eisenia fetida* (annélide olygochète). Ce test permet d'intégrer l'ensemble des effets toxiques potentiels dans la mesure où l'activité fouisseuse des vers et l'ingestion des particules de sols sont susceptibles de remobiliser une partie des contaminants. Un deuxième test d'inhibition de croissance algale avec *Pseudokirchneriella subcapitata* (algues d'eau douce), a été effectué sur les fractions lixiviables des sols (à l'eau ultrapure), à la fois à  $t_0$  et après culture de MxG en microcosmes. Ce dernier test permet directement d'intégrer à moyen terme (à l'échelle de croissance de la plante) la mobilité, la biodisponibilité et la toxicité des contaminants et métabolites de dégradation extractibles à l'eau (Eom et al., 2007; Pagnout et al., 2006).

#### **Tests de mortalité des vers de fumier *Eisenia fetida*, d'après ISO 11268-1:1993**

10 individus adultes d'*Eisenia fetida* sont mis en contact permanent avec 200 g du sol à tester maintenu à environ 80% de sa capacité de rétention d'eau. 5 réplicats (5 X 10 vers) sont réalisés par type de sol. La mortalité ainsi que la biomasse globale de chaque lot de 10 individus sont évaluées au bout de 7 et 14 jours d'exposition. Un indice de condition générale à l'appréciation de l'observateur est aussi évalué au bout de 14 jours classant les vers en catégorie « sensibles » (ou réactifs à des *stimuli* tactiles), moribonds (se déplaçant peu, ne répondant pas ou faiblement aux *stimuli*), ou morts (van Herwijnen et al., 2007).

#### **Tests d'inhibition de croissance algale, d'après AFNOR NF T 90-375 de décembre 1998**

Ce test de toxicité chronique porte sur l'inhibition de la croissance algale de *Pseudokirchneriella subcapitata*. Il s'agit de déterminer, dans les conditions définies par la norme, la concentration initiale de lixiviat de sol qui réduit en 72h de 50 % la croissance d'une algue d'eau douce, *Pseudokirchneriella subcapitata* (ex *Raphidocelis subcapitata*). La norme préconise la réalisation du test en erlenmeyers dans un volume final de 50 mL. Le test a été adapté pour être réalisé en microplaques 96 puits transparentes et statiques, avec un volume final de 250  $\mu$ L/puits. Les algues utilisées sont issues d'une solution mère de 3 jours, c'est à dire en phase exponentielle de croissance. Les essais sont réalisés à la lumière blanche continue (5000-6000 lux) et à une température de  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Les puits placés sur les bords ne sont pas utilisés mais simplement remplis d'eau distillée stérile afin d'éviter les effets de bords dus à l'évaporation. La concentration initiale en cellules dans chaque puits est de

l'ordre de 10<sup>4</sup> cellules/mL. Pour éviter des carences en nutriments, l'inoculum algal est réalisé dans un concentré de milieu de culture (milieu ISO 10X; NF T 90-375, 1998) et ajouté à raison de 25 µL par puits. Le suivi de la croissance algale en 72h est réalisé par lecture au spectrophotomètre à 665 nm. Les densités cellulaires (nb cellules/mL) sont estimées grâce à une courbe d'étalonnage. Le pourcentage d'inhibition (I) de la croissance à 72 heures pour les différentes concentrations en lixiviats de sols est donné par la formule :

$$I = [(NT - N_x)/NT] \times 100$$

où NT : nombre moyen de cellules/mL chez le témoin (milieu ISO sans lixiviat) à 72 heures

N<sub>x</sub> : nombre moyen de cellules/mL pour la concentration x de lixiviat à 72 heures.

Les concentrations en lixiviats testées sont 4, 12, 36, 44, 56, 68, 80 et 90 %, réalisées en triplicats pour chaque dilution.

## **II.3. Etudes microbiologiques**

### **II.3.1. Impact du co-métabolisme sur la sélection de souches dégradantes**

#### ***II.3.1.1. Spécifications générales***

Un ensemble de souches bactériennes du laboratoire pré-sélectionnées pour leur capacités à dégrader le pyrène (Gruber, 2005) ainsi que des souches issues de la zone du sol de friche industrielle H1 témoignant des teneurs les plus importantes en HAP (BASOL, 2008) ont été mises en culture en milieu minimum "Basal Salt Medium Yeast extracts" (BSMY, composition en annexe 3) avec une pression de sélection au pyrène et selon 4 modalités d'enrichissement. Ces modalités correspondent à différentes stratégies de dégradation impliquant le co-métabolisme du pyrène avec d'autres composés plus facilement dégradables (Gaskin & Bentham, 2005). Les modalités de sélection des souches sont les suivantes :

- pyrène uniquement : à 200 mg/L; sélection de souches capables de croître en présence de pyrène comme seule source de carbone et d'énergie (Juhasz et al., 1997);
- pyrène + phénanthrène : à 200 mg/L chacun; sélection de souches capable de croître en présence de pyrène par co-métabolisme avec le phénanthrène (Hwang & Cutright, 2002; Juhasz et al., 1997);

- pyrène + salicylate de sodium : pyrène à 200 mg/L et salicylate de sodium à 100 mg/L; le salicylate est un intermédiaire de dégradation dans certaines voies cataboliques et joue un rôle d'induction dans la transcription de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation (cf. I.2.2. Biodégradation oxydative des HAP : aspects métaboliques);
- pyrène + gasoil : pyrène à 200 mg/L et gasoil 0,2% (P/V) (filtré à 0,22 µm); permet l'augmentation de la biodisponibilité du pyrène et la stimulation de la production de tensioactifs biologiques, présence de composés pouvant être utilisés comme co-métabolites (Kanaly et al., 2000).

### ***II.3.1.2. Préparation des cultures mixtes bactériennes***

Chaque souche préalablement isolée au laboratoire (pré-sélectionnées après culture à partir de leur milieu de prélèvement supplémenté en pyrène et conservées à -80°C) est mise en culture une nuit dans 10 mL de milieu riche Mueller-Hinton (Difco) puis centrifugée (20 min, 1070 g à température ambiante). Les culots sont repris dans 4 mL de milieux minimum « Basal Salt Medium » (BSM; annexe 3) et à nouveau centrifugés. Deux lavages successifs des cultures bactériennes sont ainsi réalisés. 7,5 mL des suspensions bactériennes (dont les DO<sub>620nm</sub> ont été ajustées pour une densité finale de l'ordre de 10<sup>6</sup> bactéries/mL) sont finalement introduits dans chacun des erlens d'enrichissement contenant du milieu minimum BSM supplémenté en pyrène et divers co-métabolites (phénanthrène, salicylate ou gasoil).

Les bactéries issues de la zone du sol de friche industrielle H1 (présentant les concentrations les plus élevées en HAP) sont extraites avant leur utilisation dans les différents enrichissements sélectifs. Pour ce faire, les fractions grossières du sol sont éliminées et l'échantillon est tamisé à 2 mm puis homogénéisé. 3 sous-échantillons de 15 g (poids frais) sont réalisés et mis à agiter une nuit (25°C, 175 rpm) dans 75 mL de solution de tampon phosphate (NaCl 0,8g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,21g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,34g/L) (Gaskin & Bentham, 2005). Les 3 suspensions sont décantées 5 min puis 10 mL sont prélevés dans chacune et mélangés. 3mL de ces suspensions sont introduits dans chacun des 4 autres erlens d'enrichissement en pression de sélection [pyrène + co-métabolites], reprenant les modalités précédemment énoncées (ajout supplémentaire de phénanthrène, salicylate ou gasoil) (Gaskin & Bentham, 2005). Les cultures bactériennes ainsi préparées sont maintenues sous agitation à 25°C à 175 rpm durant 40 jours.

### ***II.3.1.3. Identification génétique des souches isolées (ADNr 16S)***

Les souches restantes sont isolées sur milieu riche (isolement non sélectif de souches capables de dégrader le pyrène ou uniquement des métabolites et production de biomasse), leur ADN génomique est extrait, amplifié par PCR (région v3 ADNr 16S) (Muyzer et al., 1993), puis séquencé (GENOSCREEN). L'identification est réalisée après comparaison des séquences à une base de données (Ribosomal Database Project, RDP) (Cole et al., 2006). Les souches isolées sont également repiquées sur gélose minimum [BSMY + pyrène] afin d'identifier celles qui sont initiatrices de la dégradation du pyrène.

### **II.3.2. Influence des exsudats racinaires sur la biostimulation des cultures mixtes dégradantes : tests en microplaques**

#### **Aspects généraux**

Le format de la microplaque a été choisi pour les tests de biostimulation pour ses multiples avantages : miniaturisation des tests (moins d'encombrement), nombre d'échantillons testés plus important (meilleure recouvrement statistique des résultats), réduction de la quantité de matériel nécessaire (Binet et al., 2000; Wrenn & Venosa, 1996). La démarche suivie pour l'ensemble des tests en microplaques est décrite ci-dessous.

Des cultures bactériennes ont été réalisées en microplaques (à 25°C) à partir des différents enrichissements sélectifs avec bactéries du laboratoire (pré-sélectionnées) et celles extraites du sol de friche. Pour l'ensemble des tests en microplaques et quel que soit la modalité expérimentale considérée, les cultures mixtes inoculées à  $t_0$  sont reconstituées à partir des souches bactériennes isolées à la suite des enrichissements sélectifs. Ces bactéries sont préalablement mises en culture une nuit puis les suspensions sont culottées, lavées et leurs D.O.  $_{620nm}$  ajustées en fonction des différents tests menés par la suite. Les tests en microplaques menés dans le cadre de ce travail portent uniquement sur la croissance et l'activité de dégradation des cultures bactériennes mixtes « globales » (pas sur la stabilité (ou viabilité) des souches composant chacune des cultures mixtes).

Les milieux riche « Yeast Extract Peptone Glucose » (YEPG, annexe 3) et milieux minimum de Bushnell-Hass (BH, annexe 3) (Bushnell & Haas, 1941) sontensemencés et supplémentés ou non en exsudats totaux de MxG et en un mélange de phénanthrène, fluorène, pyrène et fluoranthène (10  $\mu$ L d'une solution respectivement à 90/9/9/9 mg dans 8 mL d'hexane). Ces 4 HAP ont été choisis comme étant représentatifs des HAP légers et lourds

majoritairement présents sur site, le fluoranthène constituant, de surcroît, un isomère structurel du pyrène.

Les HAP sont apportés, dans les microplaques, sous forme dissoute dans de l'hexane qui est évaporé au moins 2 h sous hotte chimique. Le solvant ne constitue donc en aucun cas un apport en carbone organique supplémentaire pour les bactéries inoculées. Les HAP se retrouvent ainsi sous forme de cristaux lors de l'inoculation des milieux de cultures (Binet et al., 2000). Leur dissolution est progressive et limitée par les phénomènes de transfert de masse (Johnsen et al., 2005), la quantité de HAP initialement apportée sera exprimée en  $\mu\text{g}/\text{cupule}$ .

La croissance bactérienne est évaluée par mesure spectrophotométrique d'absorbance à 620 nm (en tenant compte de l'absorbance des différents milieux initiaux). La dégradation des substrats présents (exsudats, HAP), est estimée par différence d'absorbance (D.O.  $_{405620\text{ nm}}$ ). Ces absorbances sont mesurées à  $t_0$  pour les différentes modalités expérimentales et leur moyenne majorée d'un écart-type est retranchée aux mesures réalisées à la fin des divers temps d'incubation considérés par la suite (21 heures, 6 jours, 45 jours, 80 jours). Des essais préliminaires des différents milieux de culture incubés sans bactéries ont permis de vérifier en outre l'absence de variation significative de D.O. aux absorbances mesurées. Afin de limiter l'évaporation des milieux de culture sur les périodes considérées, les microplaques sont placées dans des étuves non ventilées sous atmosphère humide.

Les deux types de milieux (YEPG et BH) ont été choisis afin de simuler les conditions trophiques rencontrées respectivement au niveau de la rhizosphère, milieu très favorable au développement des populations microbiennes, ou au niveau du sol non rhizosphérique qui s'apparente, en revanche, à un milieu oligotrophe limitant pour la croissance bactérienne (Marschner et al., 1986). L'utilisation des différents milieux vise également à mettre en évidence les effets de répression catabolique en présence de sources de carbones rapidement assimilables (constituants du milieu riche et des exsudats racinaires).

De plus, la conduite des tests en milieu minimum de Bushnell-Hass (BH) permet de déterminer l'impact de chacun des composés carbonés ajoutés successivement (HAP, exsudats), à la fois sur la croissance et sur l'activité de dégradation bactérienne.

Les *inocula* bactériens à  $t_0$  représentent une densité optique de l'ordre de 0,02 unité d'absorbance relative correspondant à une concentration de l'inoculat de  $10^7$  cellules/mL. Au bout de 45 jours de culture dans du milieu minimum BH sans ajout de carbone, cette valeur décline pour atteindre une valeur résiduelle de 0,015 unité de D.O. confirmant que ce milieu uniquement minéral ne permet pas la croissance bactérienne (Bushnell & Haas, 1941). Par

conséquent, en milieu minimum, seules seront illustrés dans les différentes figures, les mesures d'absorbances relatives à la croissance et l'activité de dégradation bactérienne en présence de HAP, d'exsudats ou des deux composés.

Enfin, l'ensemble des résultats relevant des tests en microplaques s'étale sur une période de plusieurs mois. Chacune des séries d'expériences (avec exsudats totaux ou avec métabolites secondaires) a été réalisée avec la préparation *de novo* des différentes cultures bactériennes mixtes, entraînant notamment une variabilité intrinsèque aux conditions expérimentales et expliquant les variations observées lors des mesures d'absorbances des différentes modalités témoins. Chaque série d'expériences doit ainsi être considérée de manière complètement indépendante les unes des autres.

### ***II.3.2.1. Effet de produits rhizosphériques sur la biostimulation à court terme (21h) d'une culture bactérienne mixte dégradante***

Dans un premier temps, la biostimulation de la croissance et de l'activité de dégradation bactérienne par ajout de produits rhizosphériques de MxG a été testée sur les souches dégradantes de la culture mixte réalisée en présence de pyrène uniquement. Les cultures ont été effectuées durant 21 heures en milieu riche YEPG (dilué au 1/5<sup>ème</sup> pour limiter l'apport en nutriments et orienter les bactéries vers l'utilisation conjointe des HAP) et en milieu minimum, en présence donc de HAP.

#### Protocole de préparation des plaques :

Témoin négatif : milieu de culture (riche ou minimum) avec bactéries, sans ajout supplémentaire d'exsudats ou autre source de carbone

Témoins positifs : milieu de culture (riche ou minimum) avec bactéries et ajout d'une source de carbone supplémentaire (3 µL d'une solution de glucose ou « Yeast Extracts Peptone Glucose » (extraits de levure, peptone, glucose ou YEPG) à 12,5 mg/mL).

#### Essais :

- 200 µL / cupule de milieu riche YEPG ou de milieu minimum « Buschnell-Hass » HAP, 10 µL / cupule de solution de mélange de 4 HAP (phénanthrène + pyrène + fluorène + fluoranthène respectivement à 90/9/9/9 mg dans 8 mL d'hexane)
- 20 µL / cupule d'inoculum bactérien (de densité de 10<sup>6</sup> cellules/mL) : le protocole de préparation de la suspension bactérienne à inoculer dans les puits est le même que cité au § II.3.1.2.

- 3  $\mu\text{L}$  / cupule de produits rhizosphériques : 100 mg sont dissous dans 1 mL d'eau distillée stérile; des dilutions successives sont réalisées pour obtenir des concentrations équivalentes à 12,5; 25; 50; 100; 200 mg/mL de produits rhizosphériques (tableau 11) qui seront utilisées pour tester les effets résultants sur la biostimulation de la culture mixte (augmentation potentielle de croissance et/ou d'activité de dégradation).

**Tableau 11 : Concentrations en produits rhizosphériques testées sur la croissance de souches dégradantes à court terme (21 h).**

Concentration de la solution mère de produits rhizosphériques (mg/mL)	12,5	25	50	100	200
Quantité ajoutée en équivalent carbone ( $\mu\text{g}$ /microcupule)	37,5	75	150	300	600
% de carbone supplémentaire/milieu de culture YEPG	0,75	1,5	3	6	12

### ***II.3.2.2. Effets des exsudats sur la biostimulation de cultures mixtes dégradantes : effets chroniques***

Des essais en microplaques ont été réalisés en milieu riche YEPG (dilué au 1/10<sup>ème</sup>) et en milieu minimum de Bushnell-Hass, en présence ou non de HAP (fluorène, phénanthrène, pyrène, fluoranthène), d'exsudats racinaires de MxG (collectés après croissance racinaire dans du sable de quartz, II.1.1.2.1) et de la combinaison [HAP + exsudats]. Les tests ont été menés à partir des cultures mixtes dégradantes isolées selon les diverses modalités d'enrichissement décrites au § II.3.1 (L/S : cultures mixtes issues respectivement des souches pré-sélectionnées du laboratoire/extraites du sol de friche H1, avec : LP/SP : cultures mixtes pyrène; LPP/SPP : cultures mixtes pyrène + phénanthrène; LPS/SPS : cultures mixtes pyrène + salicylate; LPD/SPD : cultures mixtes pyrène + gasoil) ainsi qu'avec des dilutions-suspensions de microorganismes directement issus des sols de friche. Les tests ont été conduits en quadruplicats pour chacune des modalités expérimentales, avec ajout selon les cupules concernées de :

- HAP, 10  $\mu\text{L}$  / cupule de solution de mélange de 4 HAP (phénanthrène + pyrène + fluorène + fluoranthène respectivement à 90/9/9/9 mg dans 8 mL d'hexane), soit 146,25  $\mu\text{g}$ /cupule (0,65 mg/mL concentration théorique si dissolution totale)

- 200  $\mu\text{L}$  / cupule de milieu riche YEPG ou de milieu minimum Buschnell-Hass (BH, annexe 3)

- 1,4 µL / cupule de solution d'exsudats racinaires à 10 mg/mL (dissout dans de l'eau distillée stérile), soit 0,7% (v/v), l'équivalent de 14 µg/cupule (0,061 mg/mL concentration finale)

- 25 µL / cupule d'inoculum bactérien à 10<sup>7</sup> bactéries/mL.

Le suivi de la croissance bactérienne est réalisé par mesure d'absorbance à 620 nm et la biodégradation des exsudats/HAP par différence d'absorbance [D.O. 405-620 nm].

### ***II.3.2.3. Identification des métabolites secondaires potentiellement impliqués dans la biostimulation bactérienne***

#### ***II.3.2.3.1. Essais en plans factoriels complets***

Suite à l'identification des métabolites secondaires aromatiques contenus dans les exsudats racinaires de MxG, des tests en microplaques selon un plan factoriel complet sont conduits à la fois en milieu riche (YEPG dilué au 1/10<sup>ème</sup>) et en milieu minimum Buschnell-Hass (BH), en présence ou non d'un mélange de HAP (fluorène, phénanthrène, pyrène, fluoranthène), avec deux cultures mixtes isolées à partir des souches de travaux antérieurs au laboratoire (culture mixte LP) et du sol de friche (culture mixte SPP) (Tableau 12) :

**Tableau 12 : Modalités de culture de LP et SPP testées en plan factoriel complet.**

<b>Milieu de culture YEPG ou BH</b>			
<b>+ HAP</b>		<b>- HAP</b>	
<b>culture mixte LP</b>	<b>culture mixte SPP</b>	<b>culture mixte LP</b>	<b>culture mixte SPP</b>

Pour chaque culture correspondant aux 4 modalités, un plan d'expérience factoriel complet à 4 facteurs est établi, basé sur la présence ou non d'une des 4 molécules mises en évidence dans les exsudats racinaires : la quercétine, l'apigénine, l'acide gallique et la catéchine. Ces molécules sont représentatives des métabolites secondaires à structure aromatique polycyclique (quercétine, apigénine) et monocyclique (acide gallique, catéchine) identifiés majoritairement dans les exsudats racinaires. Chacun des composés a été ajouté seul ou en combinaison avec un ou plusieurs des trois autres métabolites secondaires (soit 4X4 = 16 combinaisons de molécules testées). Il s'agissait ainsi de vérifier d'une part les phénomènes de compétition entre chacune des molécules ajoutées (effets de synergie ou pas lors de l'ajout de plusieurs types de molécules) ou de répression catabolique (voire de toxicité

potentielle) d'autre part. L'étude des interactions proprement dites entre molécules, requérant théoriquement la présence de tous les composés mais à des doses variées, seront quant à elles appréhendées durant les tests de type « Uniform design » (décrits au paragraphe suivant).

Chaque puits est inoculé par : 10  $\mu\text{L}$  HAP (mélange des 4 molécules précédemment décrit) pour les modalités « + HAP », 200  $\mu\text{L}$  de milieu YEPG ou BH, 25  $\mu\text{L}$  d'inoculum bactérien à  $10^7$  bactéries/mL et 1,4  $\mu\text{L}$  solution de métabolite secondaire (seul ou en mélange équimolaire avec un ou plusieurs des 3 autres) à 17,2 mM dissout dans du méthanol et filtré à 0,22  $\mu\text{m}$ .

La concentration de 17,2 mM a été choisie comme dose élevée pour ce « screening » (ou « balayage ») des effets des métabolites racinaires, cette dose correspondant à une solution mère de catéchine à 5 mg/mL, revenant à considérer que la moitié des exsudats ajoutés est composée de métabolites secondaires.

Il s'agit uniquement dans cette partie du travail d'obtenir des informations sur les capacités « potentialisatrices » de dégradation de chacun des métabolites. Deux modalités témoins « milieu YEPG » et « milieu BH » constituent les modalités de contrôle de la croissance bactérienne avec et sans HAP, en l'absence de métabolite secondaire. Par conséquent, seul un volume de méthanol de 1,4  $\mu\text{L}$  leur est ajouté.

Le suivi de la croissance bactérienne est réalisé par mesure d'absorbance à 620 nm et la biodégradation des HAP (en présence éventuelle des 4 molécules testées) par différence d'absorbance [D.O.  $_{405-620\text{ nm}}$ ], au bout de 6 jours pour les deux types de milieux (YEPG et BH) et au bout de 45 jours pour le milieu BH.

#### ***II.3.2.3.2. Tests en plan factoriel par la méthode du « Uniform Design » (UD)***

Des essais sont conduits afin de déterminer le mélange de métabolites susceptible de promouvoir davantage la croissance bactérienne et l'activité de biodégradation bactérienne, en milieu minimum BH, en présence de pyrène, de phénanthrène, ou du mélange des 4 HAP utilisés dans le plan complet.

Les quatre facteurs sont les métabolites secondaires à structure aromatique polycyclique utilisés dans le plan d'expérience factoriel complet : quercétine, apigénine, acide gallique et catéchine. 10 niveaux représentés par 10 doses différentes de ces métabolites dissous dans du méthanol sont établis (Tableau 12), et agencés d'après la table UD (annexe 4). La dose la plus élevée (17,2 mM) correspond à la quantité utilisée lors des précédents tests en plan complet,

les doses suivantes correspondant aux termes d'une suite géométrique de raison 1/3 ( $u_{n+1} = 1/3 \times u_n$ ), jusqu'à atteindre des doses infinitésimales ( $8,7 \cdot 10^{-7}$  mM, Tableau 13).

**Tableau 13 : Concentrations en métabolites secondaires testées sur la croissance et la dégradation par les cultures mixtes LP et SPP en plans de type « Uniform Design ».**

Niveaux	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Doses (mM)	17,2	5,7	1,9	0,6	0,2	$7,1 \cdot 10^{-5}$	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$7,9 \cdot 10^{-6}$	$2,6 \cdot 10^{-6}$	$8,7 \cdot 10^{-7}$

Le suivi de la croissance bactérienne est réalisé par mesure d'absorbance à 620 nm et la biodégradation des exsudats/HAP par différence d'absorbance [D.O. 405-620 nm], au bout de 6 jours pour les deux types de milieux (YEPG et BH) et au bout de 45 jours pour le milieu BH. Les résultats sont illustrés par régression linéaire multiple lorsque les conditions requises pour la réalisation des analyses paramétriques sont remplies (normalité et homogénéité des variances). Dans le cas contraire, des comparaisons de moyenne (ANOVA et tests posts hocs) sont effectuées entre les différents groupes.

### **II.3.2.4. Essais en microcosmes**

#### **II.3.2.4.1. Essais en microcosmes « reconstitués » en sol A3 standard**

Une série d'essais en microcosmes intérieurs a été réalisée selon un plan factoriel complet à deux niveaux (présence/absence) et 3 facteurs (bactéries dégradantes, HAP (phénanthrène et pyrène), *Miscanthus x giganteus* (MxG)). Il s'agissait d'appréhender dans un premier temps en conditions « contrôlées », l'impact de la phytoremédiation avec MxG sur les communautés bactériennes (microflore totale et dégradante) et sur le devenir des HAP (fraction extractible à l'hexane). Bien que la maîtrise des facteurs mentionnés ne soit pas totale, *i.e.* interactions directes des trois composantes avec le sol, ce plan a été établi afin de s'affranchir d'un certain nombre d'effets « confondants » en situation de sols de friches. En effet, ces derniers sont généralement caractérisés par des mélanges de contaminants d'origine à la fois organique (hydrocarbures aromatiques, aliphatiques, autres polluants organiques...) et minérale (sels, métaux...), rendant difficile l'interprétation des effets biologiques (Amellal et al., 2001; Binet et al., 2000; Hinoue et al., 2004). De plus, considérant que 99% des bactéries du sol sont « non cultivables » par les techniques classiques d'ensemencements en milieux liquides (Nichols, 2007; Torsvik et al., 1990), les dénombrements bactériens d'après

la méthode du NPP sous-estime la taille réelle des populations bactériennes. Cela est d'autant plus remarquable pour les bactéries impliquées dans des processus spécifiques comme la dégradation des HAP, ces dernières constituant souvent moins de 1% des communautés bactériennes totales (Binet et al., 2000; Cébron et al., 2008).

Le sol standardisé A3 est un sol initialement stérile (« Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft », [http://www.lufa-speyer.de/soil\\_eng.html](http://www.lufa-speyer.de/soil_eng.html)) et stocké en conditions septiques au laboratoire. Les phénomènes d'adsorption-désorption des HAP de 3 et 4 cycles vis-à-vis de ce sol ont par ailleurs été décrits (He et al., 1995). Les bactéries issues des *cultures mixtes* sélectionnés par pression pyrène et divers co-métabolites (phénanthrène, salicylate, gasoil), ont été choisis comme inoculum de bioaugmentation de ce sol (§ III.3.1). L'ensemble des modalités expérimentales est résumé dans le Tableau 14.

**Tableau 14 : Plan des essais en microcosmes sur sol standard A3 (PE1), 0 : présence, 1 : absence; MxG : *Miscanthus x giganteus*, HAP : contamination en pyrène (PYR) et phénanthrène (PHE) chacun à 100mg/kg de sol sec A3, bactéries : souches dégradantes conservées au laboratoire et issues du sol de friche H1; nb indiv : nombre de réplicats, avec 1 rhizome par pot planté.**

HAP	Bact	MxG	Nom	Commentaires	Nombre d'individus
0	0	0	témoin 0	témoin négatif	4
0	1	0	témoin bactéries	viabilité des bactéries dans le sol standard utilisé (A3)	4
1	0	0	témoin HAP	devenir des HAP dans le sol	4
0	0	1	témoin plante	viabilité de MxG dans le sol standard utilisé (A3)	4
1	1	0	essai HAP-bactéries	étude dégradation des HAP en présence de souches dégradantes	4
0	1	1	essai bactéries-plante	mise en évidence de l'effet rhizosphérique sur la sélection de certaines souches bactériennes	4
1	0	1	essai HAP-plante	étude de la croissance de la plante en présence des HAP	4
1	1	1	essai HAP-bactéries-plante	<b>Etude du couplage bactéries-plante sur la biodégradation des HAP</b>	4

Les bactéries ensemencées ont préalablement été mises à croître une nuit en milieu riche et préparées comme en § II.3.1.2. La suspension bactérienne finale est ajoutée dans chacun des microcosmes par pulvérisation et retournements successifs du sol à l'aide d'une baguette en verre. La quantité finale de bactéries ajoutées est de l'ordre de  $10^6$  cellules/g sol sec (estimée par titration de la suspension bactérienne par rapport à une droite étalon). La technique du NPP développée en microplaques (Haines et al., 1996; Wrenn & Venosa, 1996)

a été adaptée pour les deux types de dénombrements bactériens (microflore totale et dégradante), permettant la comparaison des résultats.

Les rhizomes de MxG, excavés à partir d'une plantation agricole (Lycée agricole de Metz-Courcelles Chaussy, 57), sont préalablement nettoyés et lavés à l'eau distillée stérile. Des portions de rhizomes de 4-5 cm présentant un bourgeon de l'ordre du centimètre sont découpées et mis en terre dans chacun des microcosmes concernés, enfouis à 3 cm de la surface.

#### ***II.3.2.4.2. Dénombrements bactériens par méthodes culturales***

Les dénombrements réalisés en microplaques sont adaptés de la méthode du nombre le plus probable (NPP) en microplaques stériles 96 puits de (Wrenn & Venosa, 1996).

#### **Dénombrement de la microflore totale et dégradante**

L'effet rhizosphérique peut se manifester en premier lieu par une augmentation non spécifique des populations bactériennes cultivables. Ces dénombrements ont été réalisés à la suite des expériences en microcosmes dans l'ensemble des sols étudiés. Le dénombrement des populations dégradantes a également été inclus pour les sols contaminés (modalités « +HAP » du sol A3 contaminé et ceux prélevés au niveau de l'ancienne cokerie, *i.e.* H1, H2, M2) afin d'étudier l'apport des exsudats de MxG vis-à-vis de ces communautés.

Une solution-suspension de sol est tout d'abord réalisée afin d'extraire les populations bactériennes. 5 g de sol est prélevé par microcosme et mis en suspension dans un volume de 45 mL de NaCl à 0,85% (P/V) stérile contenant des billes de verre de 3 mm. L'ensemble est mis à agiter durant une heure (Corgié et al., 2006). Cette suspension est appelée dilution 100. Des dilutions en cascades d'un facteur 10 à chaque fois sont réalisées jusqu'à la dilution  $10^{-7}$ . Les dilutions  $10^{-2}$  à  $10^{-7}$  sontensemencées sous hotte à flux laminaire dans des microplaques stériles :

- 200  $\mu$ L / cupule de milieu riche YEPG (dilué à 0.1X pour croissance notamment des souches oligotrophes) ou milieu minéral Bushnell – Hass supplémenté en NaCl 0.85 %
- 25  $\mu$ L / cupule de dilution-suspension de sol
- 10  $\mu$ L / cupule de pyrène + phénanthrène à 11,25 g/L (90 mg dans 8 mL d'hexane) pour le dénombrement des HAP-dégradantes, laissé à évaporer avant ajout du milieu B-H

Chaque dilution comprend une série de 24 puitsensemencés, avec une colonne de 8 puits nonensemencés entre chaque série de dilution (puits contrôles). Les microplaques sont incubées une semaine à 28°C à l'obscurité, dans un sac en plastique fermé afin de limiter l'évaporation des milieux. Pour le dénombrement de la microflore totale, la mesure de densité optique (DO) après croissance est effectuée avec un lecteur de microplaque à 620 nm. L'ensemble des DO mesurées est convertie en séries binaires (puits positif si DO supérieure à moyenne DO contrôle majorée d'une valeur d'écartype, mesurée sur l'ensemble des puits contrôles) pour l'estimation du nombre le plus probable à 24 puits par dilution (Hugues & Plantat, 1982).

Pour le dénombrement de la microflore dégradante, les puits dont les valeurs obtenues par différence d'absorbance [D.O. 405-620 nm] sont supérieures à celles de la moyenne des puits témoins (milieu minimum + HAP, sans bactéries) sont comptabilisés comme positifs et utilisés pour l'estimation du nombre le plus probable à 24 puits par dilution (Hugues & Plantat, 1982) à l'aide d'un logiciel (Most Probable Number Calculator, USEPA, v.4.04).

Pour les dénombrements relatifs aux essais en microcosmes reconstitués avec sol A3, 1 g de sol a été prélevé par microcosme et mis en suspension dans un volume de 9 mL d'eau physiologique stérile. De plus, le choix du nombre de puits par dilution s'est porté à 5, afin de traiter à la fois l'ensemble des échantillons concernés (34 au total) tout en minimisant la lourdeur de l'expérience du plan factoriel complet et en gardant une puissance statistique suffisante (équivalent NPP à 5 tubes par dilution) (Thompson et al., 2008).

### **Dénombrement de bactéries impliquées dans le cycle de l'azote**

Peu d'études ont reporté l'impact de la contamination en HAP sur des groupes fonctionnels de microorganismes rhizosphériques comme ceux impliqués dans le cycle de l'azote alors que certaines souches oxydatrices de l'ammonium (AOB) telles que *Nitrosomonas europaea*, sont aussi capables d'oxyder une grande variété d'hydrocarbures via l'action enzymatique de l'ammonium monooxygénase (Muratova et al., 2003). En outre, la contamination en hydrocarbures peut entraîner une compétition inhibitrice de l'ammonium-monooxygénase, voire plus généralement une toxicité vis-à-vis des populations nitrifiantes, aggravant les déficits azotés des sols souvent constatés dans les sols pollués ou à faible potentiel agronomique (Muratova et al., 2003; Haynes, 2009). C'est à la fois dans l'optique de bioremédiation et de réhabilitation des sols dégradés que les dénombrements bactériens

associés aux processus de fixation de l'azote et de la nitrification ont été réalisés dans les sols H2 et M2, les cendres et le sol de « référence ».

### **Dénombrement des azotofixatrices libres**

100 µL des dilutions suspensions de sol préparées précédemment de  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$  sont ensemencées en duplicats sur gélose de Rennie modifiée (Barraquio et al., 1988; Muratova et al., 2003; Rennie & Kemp, 1981), de composition suivante (en g/L) : 0,8 g  $K_2HPO_4$ , 0,2 g  $KH_2PO_4$ , 0,5g NaCl, 0,5g  $MgSO_4$ , 5 g  $CaCO_3$ , 0,01 g  $FeCl_3$ ; 5 g sucrose, 3 g mannitol, 2,5 g acide malique, 1,5 g lactate de sodium, 1,5 g succinate de sodium, 2 g glucose et 1 mL d'une solution d'éléments traces contenant (en g/L) : 5 g  $H_3BO_3$ , 0,3 g  $Al_2(SO_4)_3$ , 5 g  $Na_2MoO_4$ , 0,5 g KI, 0,5 g NaBr, 2 g  $ZnSO_4$ , 3 g  $MnSO_4$ ; solidifié par 1,5% d'agar noble (SIGMA). Les colonies ayant poussé sont dénombrées au bout de 5 jours d'incubation à 25°C. Le nombre N de microorganismes présents dans l'échantillon pour essai est calculé, en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives, d'après la formule de la méthode AFNOR Version NF ISO 7218/A1 :

$$N = \sum \frac{C}{[V(n_1 + 0,1n_2)d]}$$

Où  $\Sigma C$  est la somme des colonies comptées sur toutes les boites retenues de deux dilutions successives et dont au moins une contient 15 colonies

V : volume de l'inoculum appliqué à chaque boite (mL)

$n_1$  : nombre de boites retenues à la 1<sup>ère</sup> dilution

$n_2$  : nombre de boites retenues à la 2<sup>nde</sup> dilution

d : facteur de dilution correspondant a la 1<sup>ère</sup> dilution retenue.

N : UFC (Unité Formant Colonie) par g de sol sec.

### **Dénombrement des bactéries oxydant l'ammonium (AOB) en microplaques** (d'après

Lipponen et al., 2004)

Pour les cendres et le sol de « référence » (PE3, Tableau 7 p119), 7 dilutions sont ensemencées ( $10^0$  à  $10^{-6}$ ), 12 puits par dilutions, soit une microplaque par échantillon de sol; la 1<sup>ère</sup> ligne de puits servant de blanc. 25 µL de dilution suspension de sol sont inoculés par puits remplis au préalable par 300 µL de milieu de culture. La composition du milieu de culture utilisé a été adaptée de (De Boer et al., 1995) et contient (en g/L) : 330 mg  $(NH_4)_2SO_4$ , 100 mg  $KH_2PO_4$ , 40 mg  $MgSO_4$ , 15 mg  $CaCl_2$  et 1 mL d'une solution d'éléments traces. Cette solution d'éléments traces est composée en g/L de : 4292 mg  $Na_2EDTA$  (Titrplex III), 1988 mg  $FeCl_2$ , 99 mg  $MnCl_2$ , 24 mg  $NiCl_2$ , 24 mg  $CoCl_2$ , 17 mg  $CuCl_2$ , 68 mg  $ZnCl_2$ , 24 mg

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> et 62 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. Du bleu de bromothymol (5 mL/L d'une solution à 0,04 % P/V dans de l'eau distillée) est rajouté comme indicateur de pH. Le pH est ajusté à 8 avec du NaOH à 1M avant autoclavage. Les plaques sont mises à incuber durant 3 mois à l'obscurité. 40 µL d'une solution de diphénylamine à 0,2% (P/V dissous dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) est ensuite ajouté à chaque puits, suivi par la mesure d'absorbance à 630 nm (coloration bleue attendue, indiquant la présence de nitrates ou nitrites). L'estimation du nombre le plus probable de bactéries à 10 puits par dilution est établi *via* un logiciel (Most Probable Number Calculator, USEPA, v.4.04.) réalisant les calculs d'après les tables de Mac Grady (Hugues & Plantat, 1982).

### **Dénombrement des bactéries nitrifiantes**

Le dénombrement de la microflore cultivable « bactéries oxydant les nitrites » (NOB) en microplaques a été adapté de la méthode décrite par Muratova et ses collaborateurs (2003). Pour les cendres et le sol de « référence » (PE3, Tableau 7), 7 dilutions sontensemencées (100 à 10<sup>-6</sup>), 12 puits par dilutions, soit une microplaque par échantillon de sol; la 1<sup>ère</sup> ligne de puits servant de blanc. 25 µL de dilution suspension de sol sont inoculés par puits remplis au préalable par 300 µL de milieu de culture. Le même milieu de culture que celui décrit pour le dénombrement des AOB est utilisé, à la différence qu'il ne contient ni (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ni bleu de bromothymol, et qu'il est supplémenté par 34,5 mg/L de NaNO<sub>2</sub>. Le pH est ajusté à 6,5 avec du NaOH à 1M avant autoclavage. Après 3 mois d'incubation, 40 µL d'une solution de réactif de Griess-Ilosvay sont ajoutés à chaque puits (0,8 % acide sulphonilique dans 5N acide acétique, 0,5 % solution d'acide alfa-naphtylamine dans 5N acide acétique) suivi de la mesure d'absorbance après 5 min à 540 nm. La coloration rouge d'un puits correspond à la présence de nitrite et le puits est alors comptabilisé comme négatif. L'estimation du nombre le plus probable de bactéries à 10 puits par dilution est établi à l'aide du même logiciel que pour les précédents dénombrements (Hugues & Plantat, 1982).

#### ***II.3.2.4.3. Etude de la diversité des communautés bactériennes par méthode PCR-TTGE (ADNr 16S) (Técher et al., 2010)***

Cette phase a consisté en la mise en place d'une procédure d'étude de la diversité bactérienne des sols basée sur le polymorphisme des ADN ribosomiques de 16 Svedberg (ADNr 16S). La démarche globale de la présente étude se situe en amont de l'analyse par PCR-TTGE. Elle comprend l'optimisation d'un protocole d'extraction et de purification d'acides nucléiques du sol, répondant à plusieurs critères : rapide, peu coûteux, reproductible et applicable aux différents sols étudiés (sols de friche pollués et sols de « référence » et

endres non pollués). L'accent a été mis sur la purification des acides nucléiques. Trois types de sols pollués (H2, M2 et E sol pollué essentiellement en métaux) prélevés au niveau de la friche industrielle retenue pour les essais de phytoremédiation par *Miscanthus x giganteus*, ainsi qu'un sol non contaminé reconstitué (sol de « référence » de croissance pour MxG) ont été utilisés comme échantillons modèles. Ces sols pollués ont permis de tester l'applicabilité de la méthode de purification d'acides nucléiques développée en présence de contaminants chimiques variés (hydrocarbures, métaux).

### **Mise au point de la méthode d'extraction-purification d'ADN de sol**

#### **Tampon de lyse**

Un tampon TENNS (100 mM Tris-HCl, 40 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mM NaCl, 0.017% P/V Napp, 1% (P/V) SDS; pH 9.5) a été élaboré durant une phase d'essais préliminaires afin de favoriser la désagrégation des particules de sol ainsi que la désorption des bactéries et des macromolécules d'ADN (Berg & Smalla, 2009; Burgmann et al., 2001; Cai et al., 2006; Frostegard et al., 1999; Miller et al., 1999; Nannipieri et al., 2006; Van Elsas et al., 1997; Zaporozhenko et al., 2006; Zhou et al., 1996). Afin de contrebalancer la contamination accrue en matière organique tout en évitant une précipitation du SDS à une concentration en NaCl trop élevée, cette dernière a été ajustée à 300 mM dans le tampon d'extraction (Roose-Amsaleg et al., 2001). Durant les expérimentations concernant les effets du pH, la base Tris a été remplacée par les sels de phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pour tamponner la solution d'extraction, en particulier aux valeurs de pH acides.

#### **Protocole d'isolement et de purification d'acides nucléiques de sol**

Afin d'obtenir de l'ADN de haut poids moléculaire, la lyse des agrégats de sol et des cellules bactériennes par « agitation aux billes » (i.e. « bead beating ») (Burgmann et al., 2001; Miller et al., 1999) a été choisie. Idéalement, une procédure d'extraction d'acides nucléiques requérant très peu d'étapes de purification assurerait une perte minimale en ADN. Pour atteindre cet objectif, deux stratégies de purification impliquant l'utilisation d'un mélange innovant de vitamines composé de pyridoxal et de thiamine (permettant une précipitation des acides humiques sans inhibition ultérieure de la PCR), précédé par l'addition de chlorure de potassium (KCl 4M) ou de bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB 10% P/V) durant la phase d'agitation, a été évaluée (Tableau 15). La forme aldéhydique de la vitamine B6, i.e. pyridoxal hydrochloré, a été testée au lieu de la pyridoxamine qui induit une moins bonne amplification par PCR des ADN extraits (Dunbar et al., 2007).

**Tableau 15 : Conditions expérimentales testées durant la première série d'optimisation de l'étape d'extraction-purification d'acides nucléiques de sol; « S » : sol de référence obtenu après modification du sol A3, non pollué.**

Conditions testées	Sols « H2 », « M2 », « E », « S » tampon TENNS * (Tris, NaCl, Napp, SDS)				Sols « M », « S » tampon PENNS ** (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NaCl, Napp, SDS)
	-	+	-	+	-
<b>KCl (4M)</b>	-	+	-	+	-
<b>CTAB (10% w/v)</b>	-	-	+	-	+ (pH variant de 5,6 à 8,4)
<b>Acides humiques (100 mg/g de sol)</b>	-	-	-	+	-

Suite aux résultats obtenus durant les premières séries d'optimisation avec le tampon de lyse TENNS sur les sols « H2 », « M2 », « E », « S », d'autres essais concernant la qualité de l'ADN extrait ont été menés avec des tampons de lyse à pH variables (tampon PENNS) sur les sols « M2 » et « S » (Tableau 15). Ces deux sols ont été choisis en raison de la difficulté persistante à extraire de l'ADN à partir du premier et à purifier l'ADN extrait pour le second. L'ensemble de ces résultats relatifs au développement de la méthode constituent le chapitre III.2.4.

Un protocole d'isolement d'ADN de sol à partir d'un tampon de lyse à pH 7,5 avec une purification par utilisation conjointe de [CTAB (15µL) + vitamines] a finalement pu être établi (Figure 20), permettant par la suite l'amplification par PCR des ADNr 16S à partir des échantillons de sols de friche et l'établissement des profils de diversité bactérienne par TTGE (Muyzer et al., 1993).

### **Désagrégation du sol et lyse cellulaire**

Peser 500 mg de sol dans un tube Eppendorf de 1,5 mL contenant 700 mg de sable lave à l'acide

Ajouter 800 µL de tampon TENNS\* et agiter ("bead-beating") durant 5 min

Ajouter 150 µL de KCL (4M) ou 15 µL de CTAB (10 %) et agiter 1 min de plus



### **Purification**

Centrifuger 12000 g Durant 5 min (température ambiante)

Récupérer le surnageant, ajouter 0,3 v/v de solution de vitamines\*\*,

Mélanger doucement par inversion et placer 2 min sur glace



### **Précipitation des impuretés résiduelles (protéines, SDS)**

Centrifuger 12000 g durant 5 min

Transférer le surnageant, ajouter 0,3 v/v de solution de solution d'acétate de potassium (KAc 3M/5M)

et placer 5 min sur glace



### **Elution sur microcolonne**

Centrifuger 12000 g durant 5 min

Transférer le surnageant, ajouter 0,3 v/v d'isopropanol, mélanger doucement par inversion

Transférer dans une microcolonne\*\*\* et centrifuger à 5400 g Durant 15 s, rejeter l'éluat

Procéder à 2 lavages avec 400 et 300 µL d'éthanol à 70% (5400 g 15 s)

avec une centrifugation finale d'une min à 5400 g

Eluer l'extrait d'ADN final dans 100 µL d'eau ultrapure et conserver à -20°C

\*100 mM Tris-HCl ou 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mM NaCl, 0.017% w/v Napp, 1% (p/v) SDS

\*\* mélange de vitamines: pyridoxal hydrochloride 1M et thiamine hydrochloride 1M, dissout dans de l'eau ultrapure et filter à 0,22 µm

\*\*\* EZ-10 Spin Column Genomic DNA Bacteria Euromedex ©

**Figure 20 : Schéma général du protocole d'extraction-purification d'ADN de sols**

(Técher et al., 2010).

### **Électrophorèse en gel d'agarose**

La comparaison de l'extractibilité/qualité de l'ADN obtenu (fragmentation) à partir des différents sols durant la phase d'optimisation de la méthode en fonction des différentes conditions testées, a été réalisée par visualisation directe des fragments d'ADN après électrophorèse en gel d'agarose. 5µL d'ADN génomique purifiée sont mis à migrer dans un gel

d'agarose à 0,8% à 120 V pendant 30 min dans du tampon TAE à 0,5 X (20 mM Tris, 10 mM acétate, 0.5 mM EDTA, pH 8), avec un marqueur moléculaire de 1 kb (SIGMA). Les gels sont pré-teintés au Gelred et visualisé sous lumière UV.

## **PCR**

Etant donné l'absorbance dans le domaine UV de traces de pyridoxal persistantes dans certains extraits d'ADN de sol (Matsuo, 2002), les ratios UV standards ne pouvaient refléter de manière pertinente la pureté de l'ADN extrait. Par conséquent, l'amplification directe sans dilution par PCR d'un 1µL d'acides nucléiques extraits fut utilisé comme indicateur de la pureté des ADN de sol extraits (Burgmann et al., 2001; Fortin et al., 2004; Lakay et al., 2007; Moreira, 1998). Les amorces universelles encadrant la région variable V3 ont été employées pour amplifier un fragment de 200 pb correspondant aux positions 341 à 534 dans la séquence d'ADNr 16S de *Escherichia coli* (Muyzer et al., 1993). La séquence de l'amorce en position 341 contient une séquence supplémentaire de 40 pdb riche en GC afin d'empêcher la dénaturation complète des doubles brins d'ADN amplifiés durant la migration électrophorétique en gradient de température (Sheffield et al., 1989). Les réactions sont réalisées dans un volume final de 50 µl contenant le tampon PCR à 1X (sans Mg<sup>2+</sup>), 25 pmol de chacune des deux amorces, 200 µM de chaque désoxyribonucléotide, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mg/mL BSA (« bovin serum albumin »), 1µl d'extrait d'ADN de sol et 1 unité de Taq polymérase (EUROMEDEX, France) par réaction. Un décrétement de température de 1°C tous les deux cycles d'amplification a été réalisé (« touchdown PCR »), allant d'une température initiale d'hybridation à 65°C durant le 1<sup>er</sup> cycle de PCR à 55°C après 19 cycles, favorisant l'amplification des ADN faiblement représentés lors des premiers cycles (Don et al., 1991). Le programme est le suivant : dénaturation à 94°C pendant 40 s, hybridation durant 30 s et extension à 72°C pendant 40 s. 15 cycles d'amplification additionnels sont réalisés à 54°C. Afin d'éliminer les doubles-bandes artéfactuelles observables en TTGE, une dernière étape d'élongation à 72°C durant 20 min a été ajoutée (Janse et al., 2004). La vérification des amplifications d'ADNr 16S est faite par migration de 5 µl de produits PCR en gel d'agarose à 1,5% P/V, préteint au Gelred (concentratin finale à 1X) avec un marqueur moléculaire de 100 pb (MBI Fermentas, Amherst, NY, USA) and et visualisé sous lumière UV.

## **Migration en TTGE et identification génétique**

La migration en TTGE est réalisée avec un système électrophorétique de BioRad (Dcode, Universel Mutation Detection System, BioRad). Le gel de polyacrylamide [6% P/V

acrylamide, 0,21% P/V bisacrylamide, 8 M urée, 1,25 X TAE et 0,2% V/V glycérol] polymérise durant au moins 1h. Les produits PCR (200-600 ng d'ADN) migrent dans du tampon TAE à 1,25 X à voltage constant de 110 V, avec un gradient de température allant de 57 à 67°C (augmentation de température de 2°C/h). Le gel est ensuite teinté au nitrate d'argent d'après le protocole de Han et ses collaborateurs avec quelques légères modifications (Han et al., 2008). Le gel est imprégné durant 5 min dans une solution de nitrate d'argent [1% HNO<sub>3</sub>; 0,1% AgNO<sub>3</sub>] (permettant la capture d'image par photographie dans le visible et la conservation des gels après séchage entre feuille de cellulose) puis rincé deux fois 5 s dans de l'eau distillée. La révélation des bandes d'ADN se fait par immersion du gel dans une solution contenant [2% NaOH; 0,04% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 2 mL 37% HCOH/L]. Elle est stoppée par ajout d'eau distillée. Les profils de migration sont comparés *via* la méthode de "clustering" UPGMA (« Unweighted Pair Group with Mathematical Averages », BioRad, Quantityone software v.4), ne prenant en considération que la présence/absence de bandes dans le calcul de similarité des différents profils.

Les bandes d'intérêts après migration sur le gel de TTGE sont excisées à l'aide d'un scalpel stérile. L'ADN est élué suite à une incubation dans de l'eau ultrapure stérile durant une nuit à 37°C. Un échantillon (1µL) est à nouveau amplifié (à l'aide des amorces 534R et 341F, sans GC-clamp) et utilisé pour séquençage du fragment codé par l'amorce 534R (Phillips et al., 2006). A l'issue de ce séquençage (GENOSCREEN), l'identification de la souche bactérienne (représentée par la bande d'ADN excisée) est réalisée après comparaison de la séquence à une base de données (Ribosomal Database Project, RDP) (Cole et al., 2006).

## **II.4. Traitement statistique des données**

L'ensemble des tests statistiques sont effectués à l'aide du logiciel SigmaStat v.3.5. Les résultats correspondent à la moyenne  $\pm$  écart type d'au moins 3 valeurs indépendantes pour chacun des dosages et mesures effectués. La normalité des échantillonnages et l'homogénéité des variances entre les différents groupes sont d'abord vérifiées. Pour cela, les tests de Kolmogorov-Smirnov et de Levene sont respectivement effectués ( $p < 0,05$ ). Si les deux conditions sont remplies, *i.e.* normalité de la distribution et homogénéité des variances, le test *t* de Student est réalisé pour les comparaisons de moyennes entre deux groupes. Ce test est utilisé lors des essais de biostimulation bactérienne en plan complet (en microplaque avec

les métabolites secondaires de MxG) pour comparer la croissance puis l'activité de dégradation des cultures bactériennes avec et sans HAP (selon les différentes modalités expérimentales retenues). Pour les comparaisons par rapport à un groupe témoin (milieu riche ou milieu BH sans ajout de métabolite secondaire), le test de Dunnett est employé ( $p < 0,05$ ).

Concernant les tests de biostimulation bactérienne où une approche de type « Uniform Design » a été adoptée, la régression linéaire multiple a été choisie, prenant en compte l'existence de plusieurs variables indépendantes (4 métabolites secondaires testés à 11 niveaux différents), afin d'en dégager les effets majeurs.

Pour la comparaison de plusieurs groupes où seul l'effet de la présence de MxG est évalué, une ANOVA à un facteur est d'abord effectuée : c'est le cas dans les essais en microcosme de sol reconstitué (sol A3 du PE1) puis de sols de friche (sols H1, H2, M2 et cendres volantes), avec mesures de la croissance des plantes (incluant taille, biomasse, teneurs en chlorophylle), des concentrations en HAP restant après culture et de divers paramètres physicochimiques dans les sols. Si une différence significative entre les échantillons est observée, il s'en suit un test post-hoc afin de savoir entre quels groupes se situe la différence. Le test de Student Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) est utilisé pour déterminer entre quels échantillons se situe la différence. Dans le cas de groupes ayant un nombre d'échantillons variable, le test de Dunn est réalisé à la place du test de Student Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). En revanche, pour les tests de biostimulation bactérienne en milieu riche où deux facteurs ( $\pm$  HAP,  $\pm$  exsudats de MxG) sont considérés, des ANOVA à deux facteurs sont donc réalisées. Il en est de même pour les essais de culture de MxG en sol standard A3 (PE1) où les effets de trois facteurs ( $\pm$  HAP  $\pm$  bactéries dégradantes  $\pm$  MxG) sont analysés lors des dénombrements bactériens ( $p < 0,05$ ).

Dans les cas où la normalité des distributions n'est pas vérifiée, les échantillons sont comparés d'après le test de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Si une différence significative entre les échantillons est observée, la même démarche relative aux tests post-hoc précédemment énoncée est suivie.

### **III. RESULTATS ET DISCUSSION**

#### **III.1. Impact des exsudats racinaires sur la biodégradation des HAP par co-métabolisme : études *in vitro***

##### **III.1.1. Détermination des profils de contamination en HAP des sols de friche et choix des molécules à tester**

Dans un premier temps, les profils de contamination en HAP des sols de friche étudiés ont été établis (Figure 21). Il s'agissait de disposer d'une connaissance plus approfondie des polluants présents avant d'étudier l'apport des exsudats racinaires de MxG vis-à-vis de leur dégradation (par co-métabolisme exsudats-HAP; essais *in vitro*, § II.3.1). Dans un second temps, le suivi de ces polluants servira également de support à la compréhension des mécanismes de dégradation à une échelle d'observation plus complexe (essais en microcosmes, II.1.2).

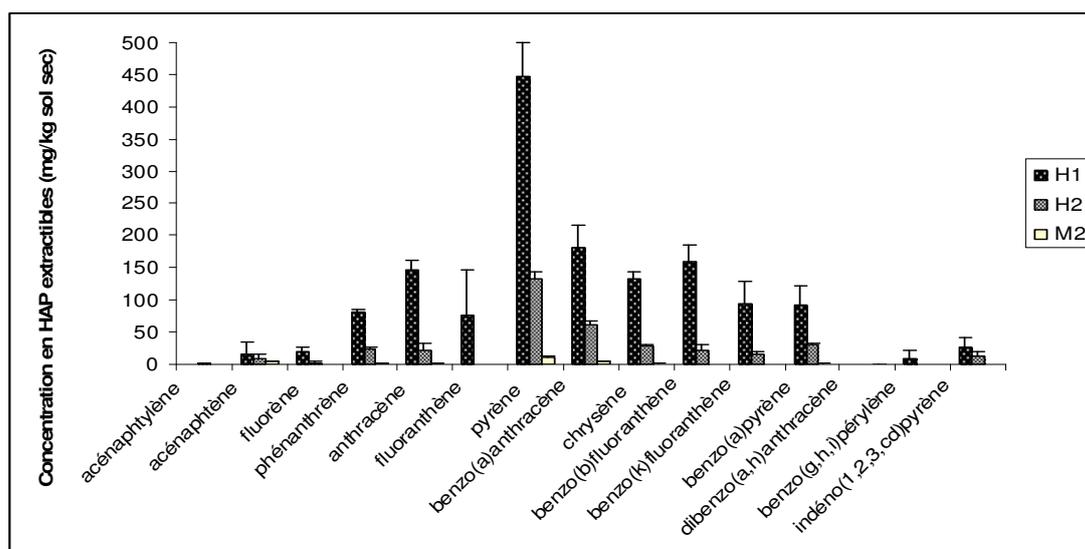


Figure 21 : Profil des teneurs moyennes en HAP dans les trois sols de friche contaminés H1, H2 et M2, (valeurs moyennes  $\pm$  erreur type, n = 5).

La représentation graphique des différents profils de contamination en HAP permet de souligner la prédominance du pyrène (4 cycles) parmi les HAP « lourds » dans les trois sols de friche (Figure 21). Le sol H1 (III.2, PE1f) a en outre la teneur la plus élevée en HAP totaux (1480,6 mg/kg sol sec). Le sol H2, échantillonné dans la même zone que le sol H1, présente des teneurs en HAP plus faibles : globalement 3,8 fois moins de HAP totaux que H1 (403,5 mg/kg sol sec contre 1480,6 pour H1).

La teneur en HAP de ces sols s'explique de par l'historique du site (zone de traitement des gaz et de déchargement du coke) (BASOL, 2008). En comparaison, le sol M2 contient des concentrations en HAP à l'état de « traces » en comparaison à H1 et H2 : globalement 59 fois moins de HAP totaux que H1 (24,9 mg/kg sol sec contre 1480,6 pour H1; Tableau 15). Les valeurs mesurées pour le sol H1, élevées malgré la cessation des activités sur le site il y a 30 ans (1480,6 mg/kg sol sec, Tableau 15), indiquent la présence d'une fraction de « résidus liés » récalcitrante à la dégradation. Cette fraction résulte généralement des phénomènes de « vieillissement » du sol qui se manifestent par une diminution de la désorption des HAP adsorbés à la matière organique (avec migration et séquestration dans les micro- et nanopores du sol, (Bogan & Sullivan, 2003; Nam et al., 1998) ou une diminution de la dissolution des HAP compris dans la « phase liquide non aqueuse » (incluant les goudrons de houille) (Mahjoub et al., 2000; Yeom et al., 1996).

Pour ces trois sols, l'anthracène, le phénanthrène ainsi que le fluorène constituent les contaminants les plus représentés concernant les HAP « légers » (moins de 4 cycles). Ces trois molécules ainsi que le fluoranthène (isomère structural du pyrène) seront par conséquent utilisés dans les essais de biostimulation *in vitro* de la dégradation des HAP par co-métabolisme exsudats de MxG-HAP.

*En définitive, ces trois sols comportent des degrés de contaminations variables mais représentatifs de ceux reportés pour les sols de friche lié à l'industrie du charbon, avec une prédominance de HAP « lourds » (4 cycles et plus) (Haeseler et al., 1999; Hwang & Cutright, 2002). Le pyrène, HAP récalcitrant à la dégradation (du fait de sa stabilité électro-chimique liée à la délocalisation des électrons  $\pi$  dans l'ensemble de la molécule), sera utilisé comme molécule de référence pour l'enrichissement de cultures bactériennes mixtes dégradantes dans la première partie de ce travail.*

### III.1.2. Collecte et identification des exsudats racinaires de *Miscanthus x giganteus*

Dans le cadre de l'étude de la biostimulation de la croissance et de l'activité des communautés bactériennes, en particulier celles impliquées dans la dégradation des HAP par co-métabolisme, l'identification des sécrétions racinaires de *Miscanthus x giganteus* a suivi celle des profils de contamination des sols. Ce travail a tout d'abord reposé sur une phase exploratoire (échantillons non répliqués) durant laquelle les trois classes majeures de molécules exsudées (acides aminés, sucres et acides organiques) ont été analysées en tant que composés pouvant supporter de manière non sélective le développement des communautés bactériennes telluriques. Dans un premier temps, les teneurs en acides aminés ont été évaluées dans les composés organiques solubles accumulés au niveau rhizosphérique (produits rhizosphériques collectés dans de l'eau distillée). Elles ont été comparées à celles issues d'exsudats racinaires *stricto sensu* (extraction dans 0,01 M CaSO<sub>4</sub>). Cette dernière méthode, en simulant les conditions de pression osmotique régnant dans les sols, permet une estimation plus précise de la quantité effectivement exsudée par les racines en un temps donné (Cakmak et al., 1988). L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 16.

**Tableau 16 : Comparaison de la teneur en acides aminés des produits rhizosphériques de MxG (collectés dans de l'eau distillée) à celle des exsudats racinaires (collectés dans 0,01M CaSO<sub>4</sub>).**

Acides aminés	Produits rhizosphériques (eau distillée)		Exsudats (CaSO <sub>4</sub> )		Ratio P/E*
	Concentration (µg/g sécrétion racinaire)	% fraction totale	Concentration (µg/g sécrétion racinaire)	% fraction totale	
Alanine	207,76	1,60	22,14	5,24	9,4
Arginine	201,22	1,55	18,98	4,49	10,6
Acide aspartique	634,00	<b>4,87</b>	79,80	<b>18,88</b>	7,9
Cystéine	109,21	0,84	32,42	7,67	3,4
Acide glutamique	512,58	3,94	31,59	7,47	16,2
Glycine	125,64	0,97	37,63	<b>8,90</b>	3,3
Histidine	102,81	0,79	8,02	1,90	12,8
Isoleucine	297,07	2,28	2,14	0,51	<b>138,8</b>
Leucine	17,94	0,14	3,34	0,79	5,4
Lysine	529,09	4,07	39,13	9,26	13,5
Méthionine	17,53	0,13	2,14	0,51	8,2
Phénylalanine	244,80	1,88	9,95	2,35	24,6
Proline	8637,76	<b>66,41</b>	36,56	<b>8,65</b>	<b>236,2</b>
Sérine	625,47	<b>4,81</b>	50,93	<b>12,05</b>	12,3
Thréonine	203,18	1,56	17,46	4,13	11,6
Tyrosine	80,22	0,62	14,35	3,40	5,6
Valine	461,10	3,54	16,09	3,81	28,7
<b>Somme</b>	13007,38	100	422,67	100	30,77

\* : ratio des concentrations (µg/g sécrétion racinaire) en [produits rhizosphériques H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> / exsudats CaSO<sub>4</sub>].

Dix-sept des acides aminés ont été mis en évidence parmi les produits rhizosphériques de MxG (Formanek et al., 2009; Hromadko et al., 2010), qui se retrouvent également dans les exsudats racinaires *stricto sensu* (Tableau 16). Le tryptophane, la glutamine et l'asparagine n'ont pu être détectés dans les conditions expérimentales. Les acides aminés peuvent directement servir de substrat de croissance pour les microorganismes (Marschner et al., 1986; Nguyen, 2003; Yoshitomi & Shann, 2001). L'isoleucine et la proline se démarquent clairement des autres acides aminés de part leur concentration respectivement 138,8 et 236,2 fois plus élevées dans les produits rhizosphériques que dans les exsudats extraits au CaSO<sub>4</sub> (Tableau 16). La proline et dans une moindre mesure l'isoleucine peuvent être impliqués dans les phénomènes de chimiotactisme vis-à-vis des bactéries promouvant la croissance végétale (ex : *Pseudomonas* sp.; Singh et al., 2001). Dans le contexte de la bioremédiation, l'accumulation transitoire de certains acides aminés comme l'isoleucine pourrait également favoriser la croissance sélective de souches à phénotype dégradants (ex : *Citrobacter* sp.; Mohammadi et al., 2007).

Les disparités moins marquées dans la répartition (% fraction totale) des différents acides aminés identifiés dans les exsudats extraits au CaSO<sub>4</sub>, indiquent un profil d'exsudation très différent des composés collectés au niveau rhizosphérique. Aussi, l'identification des sucres majoritaires sécrétés par MxG, molécules par ailleurs rapidement assimilables par les microorganismes rhizosphériques, a été poursuivie à partir d'extraits obtenus *via* la méthode de collecte au CaSO<sub>4</sub> (tableau 17).

**Tableau 17 : Identification des sucres majoritaires présents dans les exsudats racinaires de MxG**  
(collectés dans 0,01M CaSO<sub>4</sub>).

Sucres	Concentration (µg/g racine sèche/h)
Sucrose	105,75
Arabinose	27,79
Glucose	18,44
Fructose	14,84

Quatre sucres, sources d'énergie et de carbone rapidement assimilables, ont aussi été détectés dans les exsudats racinaires (Tableau 17). Ils sont susceptibles de favoriser le développement non spécifique des populations bactériennes mais aussi d'intervenir dans les phénomènes de chimiotactisme, *e.g.* glucose (Chuiko & Kurdish, 2004; Cunningham et al., 1996; Nguyen, 2003). Les sucres ainsi que les acides aminés peuvent également intervenir dans des phénomènes de répression catabolique, en particulier lorsque les autres molécules

organiques en présence sont plus difficilement assimilables, *e.g.* HAP (Stülke & Hillen, 1999) (Tableau 6, p83).

Afin de disposer d'un support mieux maîtrisé dans la compréhension des mécanismes induisant la rhizodégradation des HAP *ex planta*, *i.e.* stimulation des communautés bactériennes dégradantes autochtones, la détermination de la composition en analogues structuraux des HAP, molécules de type acides organiques aromatiques (Tableau 18) et métabolites secondaires polyphénoliques tels que flavonoïdes et dérivés (Tableau 19), a été réalisée. Ces composés, du fait de similitudes structurales partielles avec les micropolluants, seraient susceptibles d'induire l'expression génique des enzymes impliquées dans la dégradation des HAP par co-métabolisme (Crowley et al., 2000; Singer et al., 2003). Toutefois, ils ne représentent généralement qu'une fraction minoritaire des molécules exsudées (Phillips, 2008), leur mise en évidence n'a été rendue possible qu'à partir de l'analyse des extraits aqueux (eau distillée) des exsudats racinaires de MxG. Dans un premier temps, les teneurs en acides organiques de structure phénolique, dérivés du métabolisme des composés lignifiés, a été déterminée dans les produits rhizosphériques (Tableau 18).

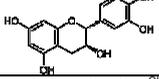
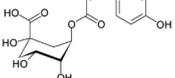
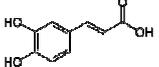
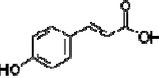
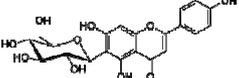
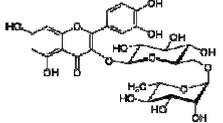
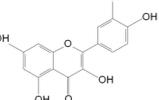
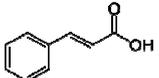
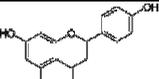
**Tableau 18 : Composition en acides phénoliques des produits rhizosphériques de MxG (collectés à l'eau distillée).**

Acides phénoliques	Concentration (µg/g produits rhizosphériques)
acide parahydroxybenzoïque	89,03
acide parahydroxybenzaldéhyde	119,75
acide 3,4 diméthoxycinnamique	105,46
acide vanillique	5,82
acide caféique	4,40

Cinq acides phénoliques ont été mesurés au-delà du seuil de détection, à des concentrations du même ordre que celles reportées pour la majorité des acides aminés (~4,40 à 119 µg/g produits rhizosphériques, Tableau 18). Les acides *p*-hydroxybenzoïque et vanillique sont des constituants de la lignine dont ils peuvent être libérés par hydrolyse alcaline. Concernant les acides cinnamiques, quatre sont également très largement répandus chez les végétaux. Pratiquement tous les organes végétaux contiennent notamment de l'acide caféique et *p*-coumarique (Bate-Smith, 1962). La présence naturelle de ces composés aromatiques dans l'environnement est un des facteurs explicatifs de la capacité répandue chez les bactéries de la dégradation de composés aromatiques (Singer et al., 2004). L'utilisation de plantes riches en tissus lignifiés comme MxG (Lewandowski et al., 2000) pourrait donc constituer un atout supplémentaire dans la prévalence de ce phénotype de dégradation.

De l'acide *p*-coumarique, essentiellement issu de la dégradation des composés lignifiés dans les sols, avait également été détecté. Pour identifier les analogues structuraux des HAP de type métabolites secondaires (flavonoïdes et dérivés), les exsudats ont été collectés après culture des plantes dans du sable de quartz, substrat « pauvre » favorisant la production de métabolites secondaires (D'Arcy, 1982; Lattanzio et al., 2009). Les résultats sont illustrés au tableau 19.

**Tableau 19 : Concentration relative en polyphénols extractibles au méthanol (mg/mL) dans les exsudats racinaires de MxG; classés du temps de rétention le plus faible au plus élevé, n = 3, ld : valeur inférieure à la limite de détection. (Técher et al., 2011)**

Composé aromatique	Concentration (mg/mL d'extrait méthanolique)	Structure moléculaire	Commentaires
Acide gallique	0,711 (± 0,006)		retrouvé sous forme d'esters (gallates de catéchine)
Catéchine	0,062 (± 0,003)		retrouvée sous forme estérifiée avec l'acide gallique
Acide chlorogénique	<i>ld</i>		dérivé de l'acide hydroxycinnamique
Acide caféique	0,062 (± 0,002)		dérivé hydroxylé de l'acide <i>p</i> -coumarique
Acide <i>p</i> -coumarique	0,071 (± 0,003)		dérivé de l'acide cinnamique, précurseur de centaines de métabolites II <sup>res</sup>
Isovitexine	0,846 (± 0,004)		forme hétéroside de l'apigénine (apigénine-6-C-glucoside)
Rutine	1,889 (± 0,008)		forme hétéroside de la quercétine (3-O-rutinosylquercétol)
Quercétine	1,926 (± 0,004)		- forme non osidique de la rutine
Acide cinnamique	0,086 (± 0,004)		précurseur précurseur de centaines de métabolites II <sup>res</sup> dont acide salicylique, acide gallique
Apigénine	0,966 (± 0,004)		- forme non osidique de l'isovitexine

Cinq composés majeurs sont de type flavonoïdes : la quercétine, la rutine, l'apigénine, l'isovitexine, et l'acide gallique (Tableau 19). Les acides galliques jouent un rôle prépondérant dans la structure de certains tannins dont ils sont libérés par hydrolyse acide. Il est intéressant de noter à ce sujet qu'une composition qualitative similaire en composés phénoliques (rutine, quercétine, catéchine, acides gallique, caféiques et chlorogénique) a

récemment été publiée, extraite d'une culture de « racines chevelues » de « blé noir » fourrager, plante originaire d'Asie du sud-est et également adaptée aux sols peu nutritifs (Kim *et al.*, 2009). La composition en métabolites secondaires est dominée par la présence de deux flavonoïdes : la quercétine et la rutine, avec des concentrations d'environ 2 mg/mL d'extrait méthanolique chacun (Tableau 19). La quercétine pourrait résulter de l'hydrolyse de la rutine qui en est un dérivé osidique (Vogrincic *et al.*, 2010) (Tableau 19).

*De manière générale, les acides aminés, sucres et acides organiques identifiés au niveau de la rhizosphère de MxG sont des promoteurs de croissance bactérienne non spécifiques (Cunningham *et al.*, 1996; Nguyen, 2003). Ils peuvent de fait réprimer l'expression de la voie catabolique de composés aromatiques plus récalcitrants à la dégradation e.g. HAP (Stülke & Hillen, 1999). En revanche, du fait de leur structure aromatique polycyclique, les métabolites secondaires de type flavonoïdes (Tableau 19) sont susceptibles d'induire les phénomènes de dégradation par co-métabolisme (Singer *et al.*, 2003) et par conséquent de favoriser davantage certaines voies de biodégradation des HAP (induction de l'expression génique des enzymes permettant la dégradation par co-métabolisme).*

### **III.1.3. Biostimulation de la croissance bactérienne et de l'activité de dégradation des HAP : tests en microplaques**

Afin d'apporter des éléments de réponse quant aux mécanismes de rhizodégradation des HAP *ex planta*, l'impact des exsudats racinaires de MxG sur la dégradation par co-métabolisme exsudats-HAP a d'abord été étudié *in vitro*. Pour ce faire, la biostimulation de cultures bactériennes mixtes dégradantes en présence ou non de HAP et d'exsudats racinaires a été évaluée par des mesures de croissance et d'activité catabolique.

#### ***III.1.3.1. Isolement et identification de cultures bactériennes mixtes dégradantes***

L'étude de l'influence du co-métabolisme dans la biodégradation des HAP a débuté par l'isolement et l'identification de cultures mixtes dégradantes. Il s'agissait d'identifier un panel de souches bactériennes pré-sélectionnées pour leurs capacités à dégrader le pyrène et les souches bactériennes issues du sol de friche industrielle H1 (témoignant de la plus forte

contamination en HAP, Tableau 15), impliquées dans la dégradation des HAP. En effet, la biodégradation des HAP dans les sols, en particulier ceux à hauts poids moléculaires (4 cycles et plus), résulte généralement de l'action combinée de bactéries agissant successivement en coopération ou de manière opportune à chacune des étapes du catabolisme (Johnsen et al., 2005). Afin de mettre l'accent sur les phénomènes de dégradation par co-métabolisme, des enrichissements sélectifs en présence de pyrène et de divers co-métabolites (phénanthrène, salicylate, gasoil) ont été réalisés en milieu minimum, d'après les méthodes reportées par Gaskin et Bentham (2005). Les différentes « stratégies » de dégradation utilisées par les diverses cultures mixtes ainsi que l'impact des exsudats racinaires de MxG sur leur croissance et leur activité de dégradation pourront être mises en relation ultérieurement, *i.e.* au cours des essais de biostimulation *in vitro* (II.3.2). Ainsi, une augmentation de croissance bactérienne associée à une dégradation accrue des HAP, ou encore la spécificité d'action de ces exsudats sur certaines cultures mixtes, sont autant d'hypothèses qui pourront être éprouvées durant les essais de biostimulation. En outre, la sélection, parmi les populations bactériennes majoritaires au niveau rhizosphérique (au cours des essais de culture en sols contaminés (II.1.2), de souches dégradantes affiliées à celles présentement isolées pourrait également être appréhendée par la suite.

Les co-métabolites ou dérivés d'hydrocarbures, choisis comme éléments de « pression de sélection » pour la croissance bactérienne dans l'enrichissement des différentes cultures mixtes, représentent autant de sources de carbone assimilables que de « stratégies » de dégradation par co-métabolisme :

- pyrène seul : sélection de souches initiatrices de la dégradation (Juhasz et al., 1997);
- pyrène et phénanthrène : sélection de souches capable de croître en présence de pyrène par co-métabolisme avec le phénanthrène (Hwang & Cutright, 2002; Juhasz et al., 1997);
- pyrène et salicylate de sodium : le salicylate est un intermédiaire de dégradation dans certaines voies du catabolisme des HAP (naphtalène, phénanthrène), pouvant induire l'expression d'enzymes dégradantes (Chen & Aitken, 1998; Euliss et al., 2008; Singer et al., 2003);
- pyrène et gasoil : augmentation de la biodisponibilité du pyrène par formation d'une phase liquide non aqueuse et stimulation de la production de biotensioactifs; présence de composés pouvant être utilisés comme co-métabolites (Kanaly et al., 2000).

Les souches restant après 40 jours de culture ont été isolées, leur ADN génomique extrait puis amplifié par PCR (Muyzer et al., 1993), et séquençé (Genoscreen). L'identification finale a été réalisée après comparaison des séquences des ADNr 16S à une base de données, le « Ribosomal Database Project » ou RDP (Cole et al., 2006) (Tableau 20). Parallèlement, à ce travail, chaque souche isolée a été mise à croître sur gélose milieu minimum supplémentée en pyrène pour vérification de leurs capacités à dégrader le pyrène.

### **Cultures mixtes isolées à partir des bactéries pré-sélectionnées (Técher et al., 2011)**

L'ensemble des résultats, relatifs aux souches pré-sélectionnées d'une part et aux souches du sol de friche d'autre part, est résumé respectivement dans les Tableau 20 et Tableau 21.

**Tableau 20 : Identification des souches bactériennes pré-sélectionnées et isolées selon les 4 modalités d'enrichissement [LP : pyrène; LPP : pyrène + phénanthrène; LPS : pyrène + salicylate; LPG : pyrène + gasoil]; en couleur : isolats proches de souches identiques référencées dans le RDP.**

Source de carbone (nombre de souches différentes isolées)	Classification phylogénétique	Séquence homologue la plus proche	Capacité à dégrader le pyrène
<b>LP : Pyrène (4)</b>	<i>α proteobacteria</i>	<i>Rhizobium galegae</i>	+
	<i>γ proteobacteria</i>	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	++
	<i>γ proteobacteria</i>	<i>uncultured Serratia sp.</i>	+
	<i>γ proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae AcOx31A</i>	+
<b>LPP : Pyrène + Phénanthrène (2)</b>	<i>γ proteobacteria</i>	<i>Ochrobactrum sp. 8M6</i>	++
	<i>γ proteobacteria</i>	<i>Serratia rubidaea</i>	++
<b>LPS : Pyrène + Salicylate (7)</b>	<i>β proteobacteria</i>	<i>Ralstonia sp. CS2</i>	-
	<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>uncultured Gemmatimonas sp.</i>	+
	<i>γ proteobacteria</i>	<i>Stenotrophomonas sp. DFK5</i>	++
	<i>γ proteobacteria</i>	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	++
	<i>γ proteobacteria</i>	<i>Enterobacter cloacae spp. cloacae</i>	++
	<i>γ proteobacteria</i>	<i>uncultured Serratia sp.</i>	+
	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>uncultured Verrucomicrobiales sp.</i>	+
<b>LPG : Pyrène + Gasoil (4)</b>	<i>γ proteobacteria</i>	<i>uncultured Acinetobacter sp.</i>	+
	<i>γ proteobacteria</i>	<i>Enterobacter sp. No. 35</i>	-
	<i>γ proteobacteria</i>	<i>uncultured Serratia sp.</i>	+
	<i>γ proteobacteria</i>	<i>Serratia rubidaea</i>	-

Un nombre variable de souches a pu être isolé en fonction des co-métabolites en présence : 4 souches pour pyrène seul (LP), 2 pour [pyrène + phénanthrène] (LPP), 7 pour [pyrène + salicylate] (LPS) et 4 pour [pyrène + gasoil] (LPG) (Tableau 20). Toutes les souches appartiennent à des genres bactériens impliqués dans la dégradation des HAP d'après la littérature (Chauhan et al., 2008; Germida et al., 2002).

L'ensemble des souches issues de la modalité d'enrichissement pyrène seul et [pyrène + phénanthrène] a témoigné de la capacité à utiliser le pyrène comme substrat de croissance (Tableau 20). En revanche, une souche, identifiée comme *Ralstonia* sp. CS2, sur les 7 isolées dans la modalité [pyrène + salicylate] ne semble pas être en mesure de métaboliser le pyrène. La proportion de souches incapables d'utiliser le HAP comme unique source de carbone et d'énergie est plus importante dans la modalité [pyrène + gasoil] où deux des quatre souches isolées n'ont pas témoigné de croissance sur gélose en présence de pyrène : *Enterobacter* sp. No. 35 et *Serratia rubidaea* (Tableau 20). La capacité des deux autres souches *Acinetobacter* sp. et *Serratia* sp. à dégrader le pyrène (notée « + ») est par ailleurs moins marquée que pour *Citrobacter amalonaticus* par exemple (notée « ++ »), isolée à partir de la modalité pyrène seul. L'ajout de gasoil, mélange d'hydrocarbures essentiellement aliphatiques, suggère un détournement des voies métaboliques bactériennes vers l'utilisation du carburant à l'instar du HAP. Cette hypothèse pourra être vérifiée par la suite durant les tests en microplaques de biostimulation [exsudats-HAP] en milieu minimum liquide à long terme (45 jours).

La souche *Citrobacter amalonaticus* est redondante avec la modalité [pyrène + salicylate] (surlignée en orange dans le Tableau 20). La modalité [pyrène + salicylate] témoigne, par ailleurs, de la plus grande diversité de souches isolées, sept au total, appartenant toutes à des genres différents : *Ralstonia*, *Gemmatimonas*, *Stenotrophomonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* et *Verrucomicrobia* (Tableau 20). Dans le cas présent, il semblerait que la présence de salicylate ait favorisé l'induction de la dégradation de HAP lourds *via* le co-métabolisme et le maintien d'une plus grande diversité de souches dégradantes métaboliquement actives. Toutefois, la croissance différentielle des colonies observée sur [gélose + pyrène] (notée « ++ », « + » et « - », Tableau 20) laisse supposer que certaines souches, en particulier *Ralstonia* (précédemment citée) peuvent s'être développées uniquement par assimilation du salicylate ou de métabolites intermédiaires de dégradation du pyrène et du salicylate. La souche *Serratia* sp. citée dans la modalité [pyrène + gasoil] est aussi redondante avec les modalités pyrène seul et [pyrène + salicylate] (surlignée en bleu dans le Tableau 20). La présence de *Serratia* sp. et de *Citrobacter amalonaticus* dans

différentes modalités d'enrichissement (LP, LPS, LPG) pourrait s'expliquer par leur capacité à initier la dégradation du pyrène.

Seulement deux souches, *Ochrobactrum* sp. 8M6 et *Serratia rubidaea*, ont été isolées en présence de phénanthrène et de pyrène, ces souches n'étant par ailleurs pas identifiées dans la modalité pyrène (Tableau 20). Le phénanthrène, étant un HAP léger à 3 cycles, il est plus facilement dégradé (Johnsen et al., 2005). Les bactéries mises en évidence seraient davantage aptes à dégrader le phénanthrène que les souches identifiées dans la modalité d'enrichissement pyrène seul (notamment les souches *Serratia* sp. et *Citrobacter amalonaticus* absente de LPP). Les capacités de *Ochrobactrum* sp. 8M6 et *Serratia rubidaea* à dégrader le pyrène (notée « ++ » pour les deux souches) indiqueraient qu'elles métabolisent le HAP par la voie de dégradation du phénanthrène (décrite à la Figure 7).

Par la suite, l'étude comparative de l'impact des exsudats racinaires de MxG sur la croissance et la biodégradation par ces différentes cultures mixtes pourrait mettre en évidence une biostimulation davantage marquée pour certains groupes du fait de la diversité des « stratégies » de dégradation impliquées; ces résultats permettraient alors de mieux appréhender les phénomènes de co-métabolisme mis en jeu et de préciser la structure des molécules contenues dans les exsudats et impliquées dans cette « biostimulation ».

### **Cultures mixtes isolées à partir du sol de friche**

Des cultures mixtes de bactéries dégradantes ont également été isolées à partir du sol de friche contaminé H1, d'après les mêmes modalités d'enrichissement (Tableau 21). L'étude de l'impact des exsudats racinaires réalisée sur ces bactéries permettra de vérifier si la biostimulation observée à partir des souches pré-sélectionnées et issues de diverses origines régionales peut être « transposée » à des souches particulièrement adaptées aux sols de friche.

**Tableau 21 : Identification des souches bactériennes isolées à partir du sol de friche contaminé selon les 4 modalités d'enrichissement [SP : pyrène; SPP : pyrène + phénanthrène; SPS : pyrène + salicylate; SPG : pyrène + gasoil]; en couleur : isolats proches de souches identiques référencées dans le RDP.**

Source de carbone (nombre de souches différentes isolées)	Classification phylogénétique (Gram)	Séquence homologue la plus proche	Capacité à dégrader le pyrène
<b>SP : Pyrène (4)</b>	<i>β proteobacteria</i> (-)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> ssp. <i>xylosoxidans</i>	++
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	<i>Stenotrophomonas</i> sp. <i>DFK5</i>	+
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	uncultured gamma proteo-bacterium <i>Pseudomonas</i> sp.	++
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>AKB-2008-E116</i>	+
<b>SPP : Pyrène + Phénanthrène (11)</b>	<i>β proteobacteria</i> (-)	<i>Delftia acidovorans</i>	+
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	bacterium <i>QLW23-isolateX</i> ( <i>Rheinheimera</i> )	+
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	<i>Stenotrophomonas</i> sp. <i>DFK5</i>	-
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>AKB-2008-E116</i>	++
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	uncultured <i>Citrobacter</i> sp.	++
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	uncultured <i>Pantoea</i> sp.	+
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	<i>Pseudomonas mendocina</i>	+
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	potato plant root bacterium <i>RC-III-94</i> ( <i>Enterobacteriaceae</i> )	++
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	uncultured gamma proteobacterium <i>Pseudomonas</i> sp.	++
	<i>β proteobacteria</i> (-)	<i>Delftia acidovorans</i>	+
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>01WB02.2-23</i>	++
<b>SPS : Pyrène + Salicylate (7)</b>	<i>β proteobacteria</i> (-)	<i>Delftia acidovorans</i>	+
	<i>β proteobacteria</i> (-)	uncultured <i>Comamonadaceae</i> bacterium	-
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>01WB02.2-23</i>	++
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	uncultured <i>Citrobacter</i> sp	++
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	uncultured maize rhizosphere bacterium <i>c9_23</i>	-
	<i>Firmicutes</i> (+)	<i>Caryophanon</i> sp. <i>AKB-2008-361A</i>	+
<b>SPG : Pyrène + Gasoil (5)</b>	<i>β proteobacteria</i> (-)	<i>Burkholderia</i> sp.	-
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	rhizosphere soil bacterium <i>RSI-39</i> ( <i>Buttiauxella</i> )	++
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	uncultured <i>Serratia</i> sp.	++
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	uncultured denitrifying bacterium ( <i>Enterobacteriaceae</i> )	+
	<i>γ proteobacteria</i> (-)	<i>Serratia</i> sp. <i>DT3</i>	++

Différentes souches bactériennes ont été isolées en fonction des modalités d'enrichissement : 4 pour le pyrène seul (SP), 11 pour [pyrène + phénanthrène] (SPP), 7 pour [pyrène + salicylate] (SPS) et 5 pour [pyrène + gasoil] (SPG) (Tableau 21). Des souches appartenant aux mêmes genres que les bactéries pré-sélectionnées (Tableau 20), ont pu être mises en évidence : *Enterobacter* (SPP, SPG), *Serratia* (SPG), *Stenotrophomonas* (SP, SPP) (Tableau 21), confortant l'idée de l'implication de ces bactéries dans la biodégradation des HAP. Des souches sont aussi retrouvées de manière redondante à travers certaines modalités : *Stenotrophomonas* sp. *DFK5*, *uncultured Pseudomonas* sp. et *Pseudomonas* sp. *AKB-2008-E116* dans les cultures mixtes SP et SPP, *Delftia acidovorans*, *Pseudomonas* sp. *01WB02.2-23* et *Citrobacter* sp dans les cultures mixtes SPP et SPS (Tableau 21, en couleur). Les capacités de dégradation du pyrène des souches isolées sont aussi variables, allant de l'incapacité à utiliser le pyrène comme unique source de carbone et d'énergie pour celle affiliée à *Burkholderia* sp. par exemple (SPG, Tableau 21) à la croissance avec halo transparent pour celle affiliée à *Citrobacter* sp (SPP et SPS, Tableau 21).

De manière similaire aux résultats obtenus précédemment (Tableau 20), davantage de souches différentes ont pu être identifiées en présence de pyrène supplémenté en phénanthrène (11 souches) ou en salicylate (7 souches) que pour le pyrène seul (4 souches) (Tableau 21), soulignant là-aussi l'importance du co-métabolisme dans la biodégradation des HAP. Par ailleurs, le phénanthrène et le salicylate étant des molécules plus solubles et par conséquent plus rapidement assimilables que le pyrène, l'utilisation préférentielle de ces composés à l'instar du HAP à 4 cycles par certaines souches pourrait expliquer les variations observées dans les capacités de dégradation.

La croissance en milieu liquide favorise généralement le développement de souches bactériennes opportunistes à taux de croissance élevé. Ces souches, dites à stratégie de développement « r », comprennent souvent des bactéries gram (-) appartenant à la division des  $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\beta$  proteobacteria isolées à partir des souches pré-sélectionnées du laboratoire et du sol de friche. Celles du genre *Pseudomonas*, retrouvés ici dans les cultures mixtes SP, SPP, et SPS (Tableau 21), sont des bactéries d'une grande versatilité dans la gamme de substances organiques dégradables et généralement très représentées dans le compartiment rhizosphérique des sols (Johnsen et al., 2005). En revanche, en présence de gasoil, aucune souche préalablement identifiée dans d'autres modalités d'enrichissement n'est retrouvée.

*Ces résultats montrent l'influence multiple du co-métabolisme lors de l'isolement de cultures mixtes bactériennes dotées de capacités de dégradation d'un HAP « lourd », en l'occurrence le pyrène. Trois éléments essentiels sont à retenir :*

- *la présence de composés aromatiques (salicylate et phénanthrène) est le facteur prépondérant pour le maintien (souches pré-sélectionnées) ou le développement (souches issues du sol de friche) d'une plus grande diversité de souches dégradantes ou résistantes aux HAP;*
- *la présence de composé à structure polycyclique plus facilement dégradable (phénanthrène) est un élément fort de pression de sélection;*
- *la biodisponibilité des molécules affecte la diversité bactérienne en orientant les souches vers l'utilisation préférentielle de substrats plus rapidement assimilables (molécules de tailles réduites avec le salicylate, phase liquide non aqueuse avec le gazoil).*

Afin de mieux appréhender ces phénomènes de co-métabolisme dans le cadre de la rhizodégradation des HAP, le système à trois composantes [HAP-bactéries dégradantes-exsudats racinaires de MxG] a d'abord été étudié « *in vitro* ». Des cultures bactériennes avec mesure de la croissance et de l'activité globale de dégradation (HAP et/ou exsudats) ont été réalisées à partir des différentes cultures mixtes précédemment identifiées (cultures « souches pré-sélectionnées » et cultures « souches du sol de friche »), en présence de HAP<sup>5</sup> et des exsudats totaux de MxG; ces derniers contenant des molécules (poly)cycliques pouvant jouer le rôle de co-métabolites de dégradation des HAP (III.1.2, tableau 19).

### ***III.1.3.2. Essais en microplaques : étude préliminaire des effets à court terme***

Dans un premier temps, l'impact des produits rhizosphériques de MxG a été évalué sur la biostimulation à court terme (21h de culture) des bactéries dégradantes de la culture mixte « LP » dans un milieu de culture riche<sup>6</sup> ou un milieu minimum (milieu minéral de Buschnell-Hass). L'emploi d'un milieu minimum permet de confirmer l'utilisation des composés en présence (HAP comprenant un mélange de phénanthrène, fluorène, pyrène et fluoranthène

---

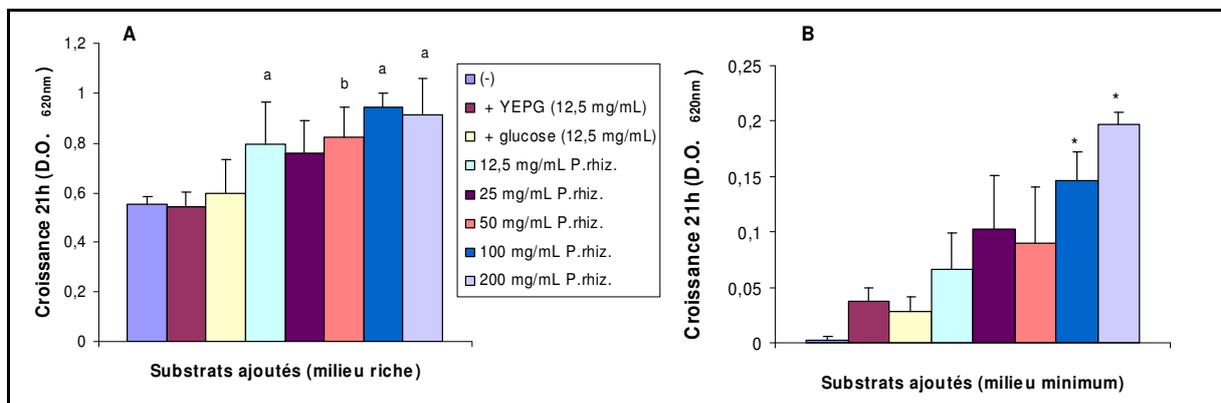
<sup>5</sup> mélange représentatif des différentes classes retrouvées *in situ* (III.1.1)

<sup>6</sup> milieu « YEPEG » utilisé pour l'isolement des différentes souches sur gélose

respectivement à 90/9/9/9 mg/L, II.3.2 et produits rhizosphériques), ces molécules étant les seules sources de carbone disponibles.

### III.1.3.2.1. Effets des exsudats sur la croissance bactérienne

Les résultats relatifs à la croissance bactérienne suite à l'ajout de différentes concentrations de produits rhizosphériques de MxG (12,5 à 200 mg/mL, II.3.2.1) sont reportés à la Figure 22, après 21h d'incubation en milieu riche (A) et en milieu minimum (B). L'apport de deux autres sources de carbone facilement assimilables (extraits de levure (YEPG) ou glucose) a été évalué en parallèle. Ces suppléments ont été apportés en concentration massique équivalente à celle de la plus faible dose de produits rhizosphériques (12,5 mg/mL) et servent d'éléments de comparaison quant à l'augmentation de croissance résultant de l'ajout des sécrétions racinaires.



**Figure 22 : Effets comparatifs de l'ajout de produits rhizosphériques de MxG, d'extraits de levure (YEPG) et de glucose sur la croissance de la culture bactérienne mixte LP.** Des mesures d'absorbance à 620 nm ont été effectuées après 21h d'incubation des bactéries : A) en milieu riche (YEPG), B) en milieu minimum de Buschnell-Hass, tout deux supplémentés par du YEPG additionnel ou glucose (à 12,5 mg/mL chacun), ainsi que des produits rhizosphériques : P.rhiz. (12,5; 25; 50; 100 et 200 mg/mL). Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 4$ ). Différences significatives entre les groupes indiquées par des lettres minuscules : A) a : par rapport au témoin milieu riche (-) sans YEPG additionnel / ou +YEPG / ou + glucose, b : par rapport témoin milieu riche (-) sans YEPG additionnel / ou +YEPG; B) \* : par rapport au témoin milieu minimum BH sans aucune source de carbone additionnelle (-).

En milieu riche, l'ajout de glucose ou de YEPG n'entraîne pas de différence de croissance (Figure 22 A) : le milieu de culture fournit en quantité suffisante tous les éléments nécessaires à la croissance bactérienne sur la durée considérée (21 h).

En revanche, à concentration massique égale (12,5 mg/mL), la croissance avec produits rhizosphériques est significativement supérieure à celle observée dans le milieu riche seul, et dans le milieu riche supplémenté en glucose ou en YEPG (Figure 22 A, a :  $p < 0,05$ ). Une augmentation de croissance est également observée pour des doses plus élevées en exsudats : 50, 100 et 200 mg/mL par rapport à ces mêmes modalités, *i.e.* milieu riche

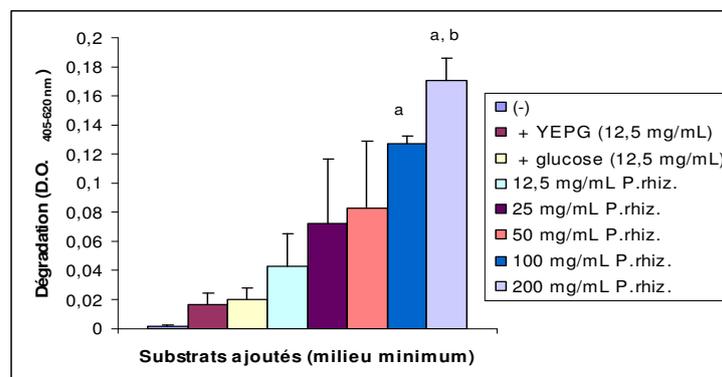
supplémenté en YEPG ou en glucose (Figure 22 A, a, b :  $p < 0,05$ ). En revanche, il n'y a pas de différence significative de croissance entre les différentes modalités contenant des produits rhizosphériques (Figure 22 A). Cette absence de relation dose-effet suggère que la biomasse bactérienne ait atteint sa croissance maximale dès la première dose de produits rhizosphériques (12,5 mg/mL) masquant les effets potentiels de doses supérieures dans les conditions expérimentales.

Par contre, en milieu minimum, l'ajout de produits rhizosphériques favorise la croissance bactérienne de façon dose dépendante (Figure 22 B). L'augmentation de croissance devient significative pour des concentrations en produits rhizosphériques supérieures ou égales à 100 mg/mL (B).

*Les résultats de la première série de culture en milieu riche ont permis de vérifier que les produits rhizosphériques de MxG, même à des doses élevées, n'inhibent pas la croissance des bactéries dégradantes (en l'occurrence celles de la culture mixte LP). Les tests conduits en milieu minimum confirment en outre la présence de molécules organiques pouvant soutenir à elles-seules le développement des populations bactériennes dégradantes à proximité des racines.*

### III.1.3.2.2. Effets des exsudats sur l'activité de biodégradation bactérienne

Les premiers tests en microplaques réalisés en milieu riche YEPG en présence de HAP n'ont pas pu témoigner d'activité de biodégradation bactérienne des polluants. Les bactéries s'orienteraient vers une utilisation préférentielle des constituants du milieu riche YEPG sur la durée d'incubation considérée (21h). Les différences de D.O<sub>405-620nm</sub> relatives aux cultures bactériennes en milieu minimum sont reportées à la Figure 23.



**Figure 23 : Effets comparatifs de l'ajout de produits rhizosphériques de MxG, d'extraits de levure (YEPG) ou de glucose sur l'activité de dégradation globale de la culture bactérienne mixte LP cultivée en milieu minimum (durant 21h). Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 4$ ). Différences significatives entre les groupes indiquées : a : par rapport au milieu minimum sans source de carbone (-), b : par rapport au milieu minimum + YEPG.**

Au contraire d'une incubation en milieu riche, où le glucose est utilisé préférentiellement aux HAP comme source de carbone, en milieu minimum, on note une augmentation de différence de D.O<sub>405-620nm</sub> en présence des produits rhizosphériques de MxG traduisant une augmentation de l'activité biodégradante de molécules polycycliques (contenues dans les exsudats et HAP) (Figure 23). Cette augmentation dose-dépendante suit un profil similaire à celui observé pour la croissance bactérienne (Figure 22 B).

*En résumé, cette première série de tests en microplaques a indiqué un pouvoir nutritif des produits rhizosphériques vis-à-vis de bactéries dégradantes, supérieur à celui d'autres sources de carbone simple (glucose) ou plus complexe (milieu de culture YEPG). La durée des incubations (21 h) ainsi que les doses d'exsudats ont permis de noter des premiers signes d'une biodégradation.*

### ***III.1.3.3. Biostimulation par les exsudats racinaires : évaluation des effets chroniques***

Des modifications de protocole ont été apportées afin de confirmer la biostimulation de la dégradation des HAP par les exsudats de MxG :

- diminution de la dose d'exsudats ajoutée à 0,061 mg/mL (concentration finale) et utilisation des exsudats collectés à partir de racines de MxG issues de sable de quartz : la quantité moindre de composés organiques rapidement assimilables (exsudats) associée à une concentration en composés phénoliques plus importante produite par les racines (III.1.2) est susceptible d'accentuer les phénomènes de dégradation par co-métabolisme exsudats-HAP.
- milieu de culture riche dilué au 1/10<sup>ème</sup> : la diminution en carbone dissout dans le milieu de culture tend également à favoriser le catabolisme de composés récalcitrants de type HAP (Tropel & van der Meer, 2004), tout en simulant les conditions nutritionnelles de la rhizosphère (milieu favorable à la croissance bactérienne).
- durée d'incubation portée à 6 jours en milieu riche et à 45 jours en milieu minimum : les phénomènes de transferts de masse des composés hydrophobes comme les HAP étant très lents et limitants pour la croissance bactérienne (Johnsen et al., 2005), l'allongement des durées d'incubation permettrait un approvisionnement soutenu des polluants en phase dissoute et une croissance mesurable (D.O<sub>620 nm</sub>) par la suite.

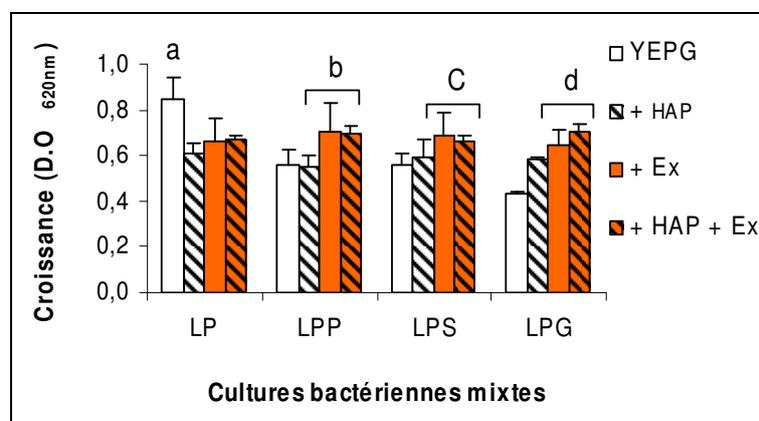
En outre, les réponses biologiques des différentes cultures bactériennes mixtes isolées, [LP/LPP/LPS/LPG] d'une part et [SP/SPP/SPS/SPG] d'autre part, seront comparées en

fonction des substrats en présence (HAP/exsudats) afin de mettre en évidence une biostimulation spécifique à certaines cultures mixtes (et phénotypes de dégradation associés).

### III.1.3.3.1. Tests en milieu riche : culture sur 6 jours

#### Cultures mixtes issues des souches pré-sélectionnées (Técher et al., 2011)

La Figure 24 illustre la croissance bactérienne en milieu riche YEPG (dilué au 1/10<sup>ème</sup>) pour les cultures mixtes issues des souches pré-sélectionnées pour leur capacité à dégrader le pyrène (LP, LPP, LPS et LPG) à l'issue de 6 jours d'incubation (phase de croissance stationnaire), supplémenté en HAP (146,25 µg/cupule) ou/et exsudats de MxG (14 µg/cupule).



**Figure 24** : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur la croissance (6 jours) des cultures mixtes issues des souches pré-sélectionnées et isolées en présence de pyrène seul (LP), de [pyrène + phénanthrène] (LPP), de [pyrène + salicylate] (LPS), de [pyrène + gazoil] (LPG). Valeurs ± écarts types (n = 4). Différences significatives indiquées par des lettres minuscules/majuscule par rapport aux groupes/facteurs non marqués.

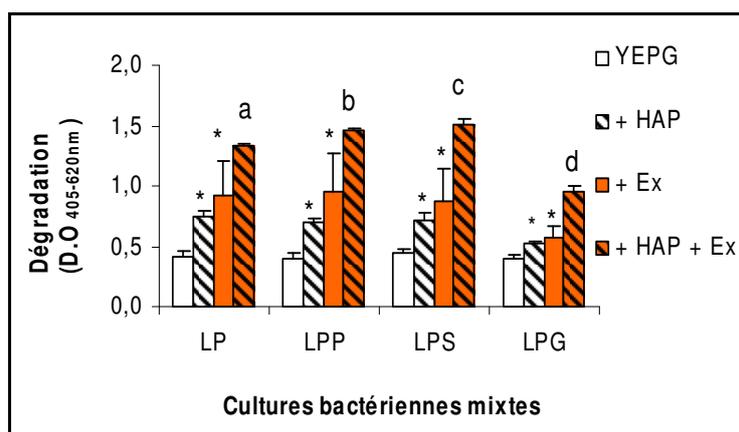
Pour LP, la croissance bactérienne la plus importante est observée en l'absence de HAP et d'exsudats (Figure 24, a : p < 0,05). En revanche, la biomasse bactérienne est identique en présence de HAP, d'exsudats ou de la combinaison des deux (Figure 24).

Pour LPP et LPS, l'ajout de HAP en milieu riche n'entraîne pas d'augmentation de croissance par rapport au témoin [milieu YEPG seul] (Figure 24 A). La croissance augmente de manière significative uniquement en présence d'exsudats ou en présence d'exsudats et HAP (Figure 24, b et C : p < 0,05).

Pour LPG, l'apport d'une source de carbone supplémentaire (+ HAP, + Ex ou + HAP + Ex) entraîne systématiquement une augmentation de croissance significative par rapport au témoin [milieu YEPG seul] (Figure 24 A, d : p < 0,05). La croissance est toutefois identique avec la présence individuelle ou simultanée des deux composés (Figure 24).

Les croissances observées montrent que les cultures mixtes obtenues après exposition à des co-métabolites de dégradation des HAP (phénanthrène, salicylate et gasoil) ont une meilleure aptitude à utiliser les HAP seuls (LPG) et les exsudats seuls ou en combinaison avec les HAP (LPP, LPS, LPG) pour leur métabolisme.

Une mesure indirecte de l'activité globale de biodégradation par les bactéries a été réalisée en parallèle à celle de la biomasse produite, *via* les différences d'absorbances (D.O. 405-620nm ; Figure 25).



**Figure 25 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur l'activité de dégradation globale (6 jours) par les cultures mixtes des souches pré-sélectionnées et isolées en présence de pyrène seul (LP), de [pyrène + phénanthrène] (LPP), de [pyrène + salicylate] (LPS), de [pyrène + gasoil] (LPG); comparaisons effectuées au sein de chaque consortium en fonction du substrat ajouté. Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 4$ ). Différences significatives indiquées : \* : par rapport à la modalité témoin YEPG (sans substrat ajouté), a, b, c, d : par rapport aux autres trois groupes.**

La biodégradation des différents types de composés organiques ajoutés ( $\pm$  HAP,  $\pm$  exsudats,  $\pm$  HAP  $\pm$  exsudats) suit un profil similaire pour les quatre *cultures mixtes*. Une augmentation significative de l'activité de dégradation de molécules cycliques est relevée suite à l'ajout des HAP et des exsudats par rapport au milieu YEPG seulement (Figure 25, \* :  $p < 0,05$ ). Concernant les HAP, une fraction des molécules initialement introduites a, par conséquent, été métabolisée (Binet et al., 2000; Wrenn & Venosa, 1996). L'allongement de la durée d'incubation à 6 jours ainsi que la dilution du milieu de culture au  $1/10^{\text{ème}}$  ont permis d'orienter les bactéries vers une utilisation non-exclusive des composés organiques facilement assimilables, limitant les phénomènes de répression cataboliques en milieu riche (Stülke & Hillen, 1999; Tover et al., 2001).

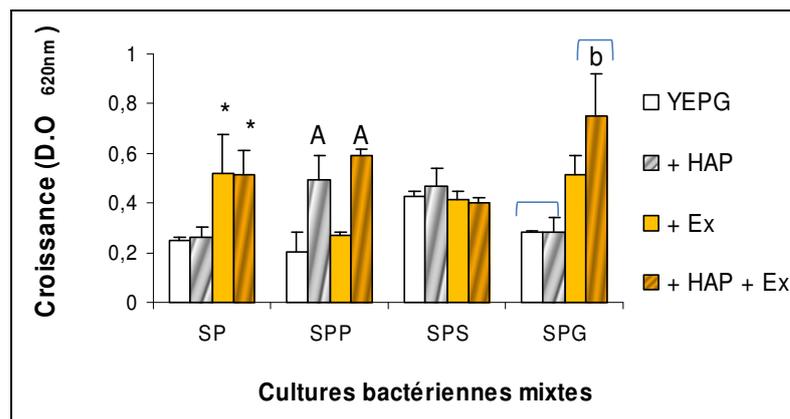
Une augmentation significative de l'activité de dégradation est également observée en présence d'exsudats pour tous les cultures mixtes par rapport au milieu riche YEPG (Figure 25, \* :  $p < 0,05$ ). Il y a dans les exsudats de MxG des molécules aromatiques (flavonoïdes et

dérivés identifiés en III.1.2), à l'instar des HAP, dont la dégradation partielle engendre la formation de métabolites intermédiaires de dégradation. De plus, l'ajout des exsudats en présence des HAP entraîne, chez les quatre cultures mixtes, une augmentation significative de la biodégradation par rapport aux trois autres modalités de culture (Figure 25, a, b, c, d :  $p < 0,05$ ). Cependant, LPG apparaît comme la culture mixte la moins performante concernant la biodégradation des HAP et des exsudats (Figure 25, a, b :  $p < 0,05$ ). Ce résultat va dans le sens de l'hypothèse émise à la suite de l'identification des souches des cultures mixtes (III.1.3.1), selon laquelle les bactéries de LPG seraient plus aptes à la biodégradation d'hydrocarbures aliphatiques contenus dans le gasoil que ceux à structure aromatique.

*De manière générale, en milieu riche, on note une augmentation de croissance essentiellement marquée par la présence des exsudats. La mesure de l'activité de dégradation témoigne toutefois d'une métabolisation des HAP et des exsudats par toutes les cultures bactériennes mixtes. Afin de vérifier i) que l'utilisation des HAP permet le développement des communautés dégradantes sur le long terme, ii) et que ce phénomène puissent être accentué en présence des exsudats racinaires de MxG, un allongement de la durée des cultures semble nécessaire.*

### **Cultures mixtes issues du sol de friche**

Les tests de croissance en milieu riche (YEPG) ont aussi été conduits avec les quatre cultures mixtes isolées à partir du sol de friche (Figure 26). Il s'agit de vérifier dans un premier temps que les exsudats ont également un effet stimulant sur la croissance des communautés bactériennes du sol et l'activité de dégradation avant d'aborder les aspects liés à la biostimulation bactérienne *in situ* (culture de MxG en sols pollués).



**Figure 26 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur la croissance (6 jours) des cultures mixtes du sol de friche, isolées en présence de pyrène seul (SP), de [pyrène + phénanthrène] (SPP), de [pyrène + salicylate] (SPS), de [pyrène + gasoil] (SPG). Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 4$ ). Différences significatives entre les groupes/facteurs indiquées : \* : par rapport à la modalité témoin YEPG (sans substrat ajouté), A, b, c : par rapport aux groupes non marqués.**

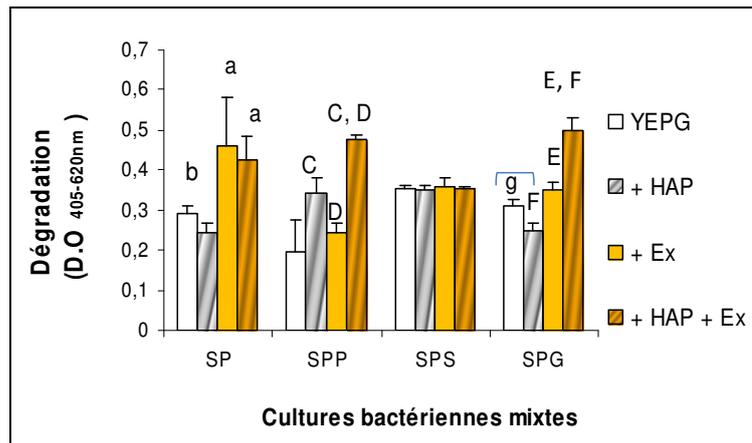
Pour la culture SP, seuls l'ajout d'exsudats racinaires ou l'ajout combiné des HAP et des exsudats, entraîne une augmentation de croissance significative par rapport à la croissance en milieu témoin YEPG (Figure 26, \* :  $p < 0,05$ ). L'utilisation des exsudats apparaît donc comme le facteur prépondérant dans l'augmentation de biomasse pour cette culture mixte.

En revanche, pour SPP, l'augmentation de la biomasse bactérienne dépend essentiellement de la présence des HAP (Figure 26, A :  $p < 0,05$ ). Au contraire de SP, les souches de SPP sont davantage aptes à dégrader les HAP et à les utiliser comme source de carbone supplémentaire.

Aucune différence significative de croissance n'est notée par rapport au milieu témoin YEPG pour SPS, quelques soient les substrats ajoutés (Figure 26). Cette culture mixte possède la plus grande versatilité métabolique, avec une utilisation efficace de l'ensemble des substrats proposés. Toutefois, la conjonction [+ HAP + exsudats] entraîne une production de biomasse plus marquée pour SPP par rapport à SPS (Figure 26).

La culture SPG, de manière similaire à SP, réagit essentiellement à l'apport d'exsudats racinaires dans ces conditions expérimentales (Figure 26, b :  $p < 0,05$ ).

L'estimation de l'activité globale de dégradation par les bactéries (D.O. 405-620 nm) confirme les résultats de croissance obtenus selon les différents substrats ajoutés pour chacune des cultures mixtes (Figure 27).



**Figure 27 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur l'activité de dégradation globale (6 jours) par les cultures mixtes des souches du sol de friche, isolées en présence de pyrène seul (SP), de [pyrène + phénanthrène] (SPP), de [pyrène + salicylate] (SPS), de [pyrène + gazoil] (SPG). Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 4$ ). Différences significatives indiquées par des lettres minuscules par rapport aux groupes non marqués.**

Un effet significatif de la dégradation des exsudats et [exsudats + HAP] observé sur la culture SP (Figure 27, A : a :  $p < 0,05$ ), indique l'assimilation partielle des sécrétions racinaires dans la croissance bactérienne. L'ajout uniquement de HAP semble induire une légère toxicité (Figure 27, b :  $p < 0,05$ ).

Pour SPP, l'ajout de HAP et [exsudats + HAP] entraîne des différences d'absorbance significativement élevées par rapport au milieu YEPG seul ou supplémenté en exsudats (Figure 27, C :  $p < 0,05$ ). Il en est de même en présence d'exsudats et [exsudats + HAP] par rapport au milieu YEPG seul ou supplémenté en HAP (Figure 27, D :  $p < 0,05$ ). La biodégradation des HAP par cette culture mixte mais également des exsudats est ainsi soulignée.

Concernant la dégradation des différents composés par SPS, le profil d'absorbance est le même que celui de la biomasse, confortant l'hypothèse d'une dégradation non spécifique des substrats présents (Figure 27).

Les résultats sont plus contrastés pour SPG. La dégradation des exsudats est confirmée (Figure 27, E :  $p < 0,05$ ). La présence des HAP seuls semble inhiber l'activité de dégradation globale en comparaison au milieu YEPG (Figure 27, g :  $p < 0,05$ ). En revanche, la conjonction des HAP et des exsudats stimule significativement l'activité de dégradation (Figure 27, F :  $p < 0,05$ ), suggérant une utilisation des HAP rendue possible en présence d'exsudats pour ce *consortium*.

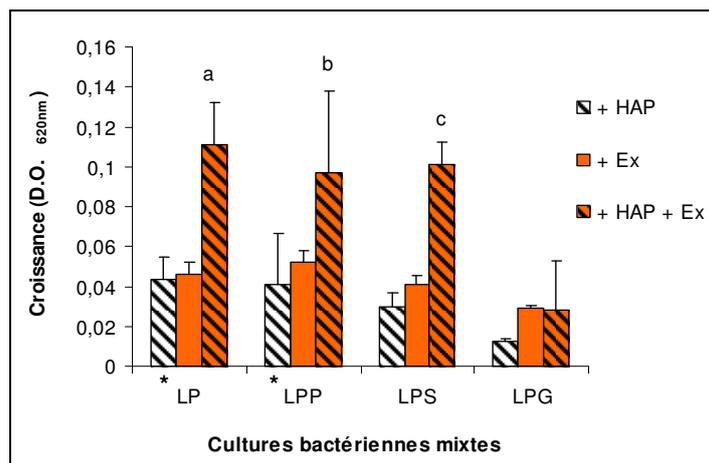
*En résumé, la croissance et la dégradation par la culture mixte SP sont essentiellement affectées par la présence des exsudats. Pour SPP, c'est l'utilisation quasi exclusive des HAP en tant que source de carbone supplémentaire qui permet d'augmenter la croissance bactérienne. L'influence des exsudats dans la dégradation ne se fait ressentir qu'en présence des HAP, rappelant le profil de réponse de SPG pour qui la métabolisation des polluants ne semble induite qu'en présence des exsudats. En revanche, aucune biostimulation spécifique n'est notée pour SPS, bien que 5 des 7 souches initialement présentes soient capables de dégrader le pyrène (Tableau 21 p160). La vérification de la stabilité des souches composant chacune des cultures mixtes permettrait d'apporter des éléments de réponses supplémentaires lors de la reconduite de telles expériences.*

*Les profils de réponse des cultures mixtes du sol de friche en milieu riche diffèrent donc beaucoup, à la fois entre eux et par rapport à ceux des souches pré-sélectionnées. La réalisation des incubations en milieu minimum a été conduite par la suite afin i) de mieux évaluer les capacités initiales de biodégradation des HAP de chacune des cultures bactériennes mixtes, ii) et de confirmer l'impact des exsudats dans la stimulation de ces capacités de dégradation.*

#### **III.1.3.3.2. Tests en milieu minimum : effets à moyen terme**

##### **Cultures mixtes issues des souches pré-sélectionnées : incubation sur 45 jours (Técher et al., 2011)**

Les tests en milieu riche portant sur la biostimulation des cultures mixtes pré-sélectionnées via l'ajout d'exsudats racinaires ont mis en évidence une nette augmentation de l'activité de dégradation pour la modalité [exsudats + HAP], laissant envisager un développement marqué de la biomasse et une accentuation de l'activité dégradante sur le long terme. Afin de vérifier ces hypothèses, les cultures en microplaques ont été reconduites sur une durée d'incubation plus longue (45 jours), en milieu minimum de Buschnell-Hass. En effet, l'utilisation d'un milieu minimum permet de confirmer la biodégradation des composés en présence (HAP, exsudats), tout en renforçant la pression sélective exercée par ces molécules qui sont ainsi les sources de carbone majoritairement disponibles. Les mesures relatives à la croissance bactérienne et à l'activité de dégradation seront illustrées en présence : des HAP (146,25 µg/cupule), des exsudats (14 µg/cupule) et du mélange des deux composés (160,25 µg/cupule). La Figure 28 représente la production de biomasse bactérienne (mesurée à 620 nm) pour les cultures mixtes composées des bactéries pré-sélectionnées.

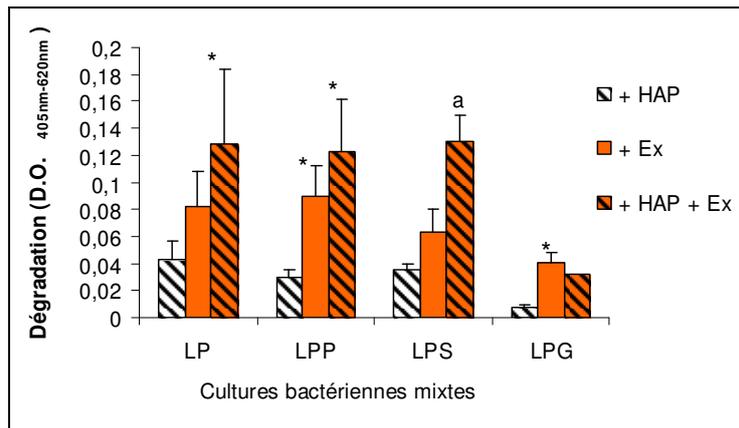


**Figure 28** : Effets comparatifs à moyen terme (45 jours) de la présence de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur la croissance bactérienne (45 jours) des cultures mixtes des souches pré-sélectionnées et isolées en présence de pyrène seul (LP), de [pyrène + phénanthrène] (LPP), de [pyrène + salicylate] (LPS), de [pyrène + gasoil] (LPG). Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 4$ ). Différences significatives indiquées par des lettres minuscules a, b et c par rapport aux trois autres groupes non marqués et \* par rapport à LPG.

Globalement, les cultures mixtes LP, LPP et LPS ont évolué de manière similaire (Figure 28). La biomasse moyenne indique une croissance bactérienne et une assimilation partielle des HAP en tant que source de carbone pour l'ensemble des souches (Figure 28). L'estimation de la biomasse bactérienne (par mesure spectrophotométrique à 620<sub>nm</sub>) de LP et LPP sont significativement supérieure à celles de LPS et LPG (Figure 28 : \* :  $p < 0,05$ ), témoignant d'une capacité de dégradation des HAP plus importante pour ces cultures mixtes.

En présence d'exsudats, la croissance microbienne est similaire à celle mesurée avec ajout de HAP pour les cultures mixtes LP, LPP, LPS (Figure 28), confirmant le pouvoir nutritif des exsudats racinaires et l'inocuité de ces composés pour les bactéries à capacité de dégradation des HAP. L'ajout simultané des HAP et des exsudats entraîne ainsi une augmentation de biomasse significative par rapport aux modalités individuelles [+ HAP] et [+ exsudats] pour LP, LPP et LPS, soulignant que les deux composés ont été utilisés sur la période d'incubation considérée (Figure 28, a, b, c :  $p < 0,05$ ).

Pour LPG en revanche, les croissances mesurées en présence des différents substrats sont moins marquées que pour les trois autres cultures mixtes, sans qu'aucune différence significative ne soit observable quelque soit la modalité de culture considérée (Figure 28). Ces résultats témoignent de la faible capacité des souches à métaboliser et à assimiler les composés aromatiques incluant les HAP.



**Figure 29** : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur l'activité de dégradation globale (45 jours) en milieu minimum par les cultures mixtes des souches pré-sélectionnées et isolées en présence de pyrène seul (LP), de [pyrène + phénanthrène] (LPP), de [pyrène + salicylate] (LPS), de [pyrène + gasoil] (LPG). Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 4$ ). Différences significatives entre les groupes indiquées par : \* : par rapport à la modalité [milieu minimum + HAP]; a : par rapport aux deux autres groupes non marqués.

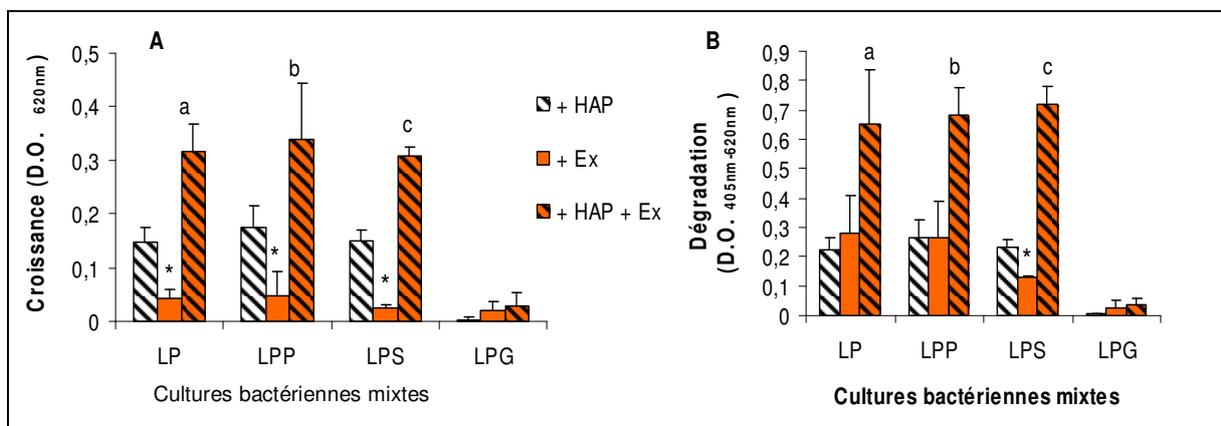
L'augmentation de croissance observée précédemment pour les trois cultures mixtes peut être expliquée par une augmentation de l'activité bactérienne de biodégradation des molécules en présence (à la fois par rapport aux exsudats et aux HAP seuls pour LPS) (Figure 29, \* :  $p < 0,05$ ). En considérant que les bactéries isolées dans LPS répondent notamment à une induction métabolique (par l'ajout de salicylate, intermédiaire de biodégradation de certains HAP), l'hypothèse d'une augmentation de la biodégradation des HAP dû à la présence de co-métabolites dans les exsudats racinaires, se trouve confortée.

En outre, la mesure de la biodégradation (Figure 29), suggère que les bactéries isolées en présence de gasoil (LPG) sont peu aptes à dégrader les composés aromatiques tels que ceux des HAP et des exsudats.

*En définitive, en milieu minimum, lorsque la pression de sélection est forte, i.e. présence uniquement de HAP en tant que source de carbone, l'ajout des exsudats de MxG favorise la croissance sélective des cultures mixtes les mieux adaptées à la dégradation des composés polycycliques (LP, LPP, LPS). Ainsi, la culture mixte au potentiel de biodégradation le moins important (LPG) est aussi celle exhibant la croissance la plus faible en présence des exsudats (Figure 28 B). Cependant, du fait de l'absorbance des métabolites de dégradation des exsudats à l'instar de ceux des HAP, il n'est pas possible de conclure sur la stimulation de la dégradation des HAP en présence des extraits racinaires.*

**Cultures mixtes issues des souches pré-sélectionnées : validation des effets à long terme (80 jours) (Técher et al., 2011)**

Les HAP étant des molécules lentement dégradables du fait de leur très faible solubilité aqueuse, les phénomènes de transfert de masse ne se déroulent pas à une vitesse suffisamment importante pour assurer une croissance rapide des populations bactériennes (Johnsen et al., 2005). Cela a pu être vérifié dans les précédents résultats avec une croissance en présence de HAP identique à celle des exsudats seuls au bout de 45 jours (Figure 28), alors que les quantités initiales en HAP sont 10 fois plus importantes qu'en exsudats (146,3 µg HAP/cupule contre 14 µg exsudats/cupule). L'augmentation de l'activité de dégradation peut être d'autant plus marquée à long terme en présence de HAP et, en particulier, du mélange [HAP + exsudats] que les populations dégradantes ont significativement augmenté dans cette dernière modalité (Figure 28). Afin de confirmer la biostimulation spécifique des communautés bactériennes dégradantes dans ces conditions expérimentales, l'ensemble des cultures (LP, LPP, LPS, LPG) a été incubé 35 jours supplémentaires, portant la durée totale de ces essais à 80 jours (Figure 30).



**Figure 30 : Effets comparatifs à long terme (80 jours) de la présence de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur la croissance (A) et l'activité de biodégradation (B) des cultures mixtes des souches du laboratoire, isolées en présence de pyrène seul (LP), de [pyrène + phénanthrène] (LPP), de [pyrène + salicylate] (LPS), de [pyrène + gazoil] (LPG). Milieu minimum de Buschnell-Hass; valeurs ± écarts types (n = 4). Différences significatives entre les groupes indiquées par : a, b, c : par rapport aux groupes non marqués; \* : par rapport à la modalité [milieu minimum + HAP].**

L'allongement de la période d'incubation met en évidence une croissance significativement plus marquée en présence des HAP qu'en présence des exsudats uniquement, que ce soit pour LP, LPP ou LPS (Figure 30, A : \* : p < 0,05). Cette augmentation de biomasse (en moyenne 4 fois plus élevée qu'à 45 jours) confirme la biodégradation et l'assimilation conjointe des HAP en tant que source de carbone et d'énergie

pour ces cultures mixtes. Pour LPG en revanche, on observe une diminution de biomasse à moins de 0,01 unité de D.O. (Figure 30, A), confirmant l'incapacité de ces bactéries à croître uniquement en présence de HAP en comparaison à LP, LPP et LPS (Figure 30, A).

Pour l'ensemble des modalités de culture avec exsudats uniquement, on note un maintien de la biomasse, voire une diminution sensible pour LPG (0,03 unité de D.O. t + 45 jours à 0,02 unité environ à t + 80 jours) (Figure 30, A), sans différence significative entre les cultures mixtes (Figure 30, B). La quantité d'exsudats initialement ajoutée (14,02 µg/cupule) a été entièrement consommée par la biomasse bactérienne. D'autre part, le déclin des populations dans LPG par rapport à LP, LPP et LPS confirmerait l'incapacité des souches à assimiler une partie des exsudats de MxG, partie que ne peuvent métaboliser que les cultures mixtes capables de croître uniquement sur HAP (Figure 30, B : b : p < 0,05).

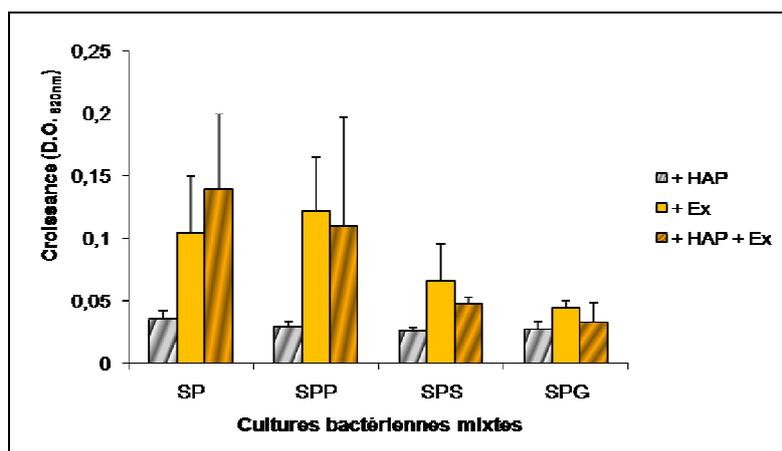
Concernant la modalité [+ HAP + exsudats], la croissance significativement marquée à 45 jours pour LP, LPP et LPS par rapport aux autres modalités d'enrichissement se confirme, globalement multipliée par trois (~0,1 unité de D.O. t +45 jours à ~0,3 unité à t +80 jours) (Figure 30, A : a, b, c : p < 0,05). En outre, la biomasse pour ces trois cultures mixtes est en moyenne supérieure à la somme de celles relevées en présence individuellement de HAP et d'exsudats (Figure 30, A), indiquant une biostimulation accrue de la dégradation des HAP chez les bactéries ayant été mises en présence simultanée des deux composés. L'écart est d'autant plus marqué vis-à-vis de LPG dont la biomasse est restée inchangée (Figure 30, A : c : p < 0,05).

*En définitive, une biostimulation de la croissance et de l'activité catabolique des populations dégradantes a pu être observée en présence du mélange [exsudats + HAP], avec des valeurs moyennes supérieures à l'addition de celles mesurées pour chacune des modalités individuelles HAP/exsudats. De plus, la stimulation de la dégradation des HAP a été mise en évidence de manière spécifique aux cultures mixtes témoignant des capacités de biodégradation les plus importantes.*

#### **Cultures mixtes issues du sol de friche : culture sur 45 jours**

Les tests en milieu riche portant sur les cultures mixtes « souches du sol de friche », avaient témoigné d'une dégradation des HAP essentiellement pour SPP et SPG (III.1.3.3.). Elle semblait toutefois conditionnée pour SPG par la présence concomitante des exsudats. Aucune biostimulation spécifique n'avait pu être notée pour SPS alors que seuls les exsudats étaient utilisés par SP. Dans le cas présent, la reconduction des tests de croissance en milieu minimum permettrait i) de vérifier les capacités initiales de dégradation des HAP par les

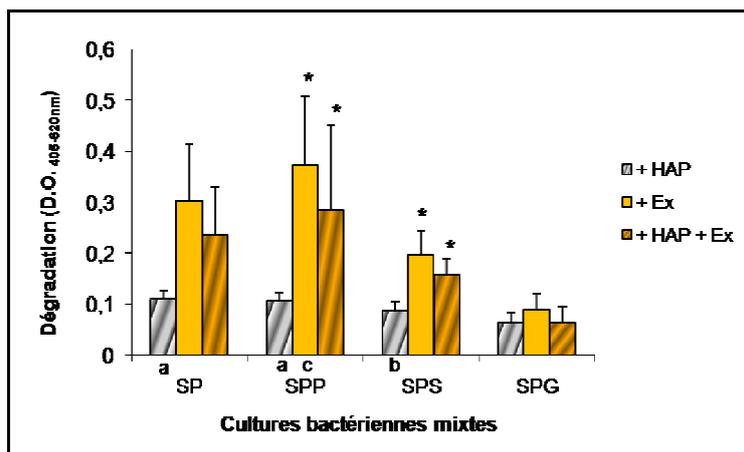
cultures mixtes, des souches dégradantes ayant été identifiées dans chacune d'elles (III.1.3.1), ii) de confirmer la biostimulation de la dégradation et de la croissance à moyen terme (45 jours) par SPP, SPG et potentiellement par SPS et SP étant donné les conditions nutritives inhérentes au milieu minimum. Les mesures relatives à la croissance bactérienne (Figure 31) et à l'activité de dégradation (Figure 32) seront donc également reportées en présence : des HAP, des exsudats de MxG et du mélange des deux composés.



**Figure 31 :** Effets comparatifs à moyen terme de l'ajout de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur la croissance bactérienne (45 jours) des *cultures mixtes* du sol de friche en milieu minimum, isolées en présence de pyrène seul (SP), de [pyrène + phénanthrène] (SPP), de [pyrène + salicylate] (SPS), de [pyrène + gazoil] (SPG). Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 4$ ). Différences significatives indiquées par : \* : par rapport à la modalité [milieu minimum + HAP].

En milieu minimum, l'évolution des biomasses bactériennes en fonction des différents substrats ajoutés, suit globalement un profil similaire quel que soit la culture mixte (Figure 31), indiquant notamment des capacités identiques à croître sur les HAP. Le phénotype de dégradation s'exprime lorsqu'il n'y a pas de source de carbone, autre que les HAP, qui soit facilement assimilable comme le glucose du milieu YEPG.

L'ajout d'exsudats uniquement entraîne une augmentation de biomasse quelles que soient les cultures mixtes considérées, mais sans différence significative par rapport à celle relevée en présence de HAP (Figure 31). Il en est de même lors de l'ajout simultané d'exsudats et de HAP (Figure 31). Les mesures d'absorbances (D.O. 405-620 nm) témoignent d'une utilisation variable des HAP et exsudats selon les cultures mixtes considérées (Figure 32).



**Figure 32 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur l'activité de dégradation globale (45 jours) par les cultures mixtes du sol de friche en milieu minimum, isolées en présence de pyrène seul (SP), de [pyrène + phénanthrène] (SPP), de [pyrène + salicylate] (SPS), de [pyrène + gazoil] (SPG). Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 4$ ). Différences significatives entre les groupes indiquées par : \* : par rapport à la modalité [milieu minimum + HAP], a : par rapport à la modalité [milieu minimum + HAP] de SPS et SPG, b : par rapport à la modalité [milieu minimum + HAP] de SPG, c : par rapport à la modalité [milieu minimum + exsudats] de SPG.**

SPG semble la culture mixte la moins adaptée à la dégradation des exsudats et [HAP + exsudats] en comparaison avec SPP, SPS (Figure 32 : a, b :  $p < 0,05$ ). Si l'ajout d'exsudats ou du mélange [exsudats + HAP] n'influence pas la dégradation pour les cultures mixtes SP et SPG, la métabolisation de ces composés reste significative pour SPP et SPS (Figure 32, \* :  $p < 0,05$ ), SPP étant la plus apte à dégrader. Cependant, l'estimation de la dégradation des exsudats et des HAP ne permet pas de conclure quant à l'utilisation conjointe de l'une et l'autre des sources de carbone en présence simultanée des deux composés (Figure 32). L'augmentation significative de dégradation pour SPP et SPS (Figure 32, \* :  $p < 0,05$ ) et de croissance (significative pour SP, Figure 32) pourrait dans ces cas être due à une utilisation exclusive des exsudats, plus solubles et biodisponibles que les HAP (Curl et al., 1987). Par ailleurs, on observe qu'avec les bactéries issues du sol de friche également, les cultures mixtes les plus aptes à dégrader les HAP (SP, SPP et SPS, Figure 32, a et b :  $p < 0,05$ ) sont aussi les plus aptes à métaboliser les exsudats, la différence par rapport à SPG dans les deux cas étant significative pour SPP (Figure 32, c :  $p < 0,05$ ).

*Les tests en milieu minimum avec les cultures mixtes du sol de friche ont indiqué des capacités de dégradation des HAP davantage marquée avec SP, SPP et SPS (bactéries sélectionnées respectivement en présence de pyrène, pyrène + phénanthrène, pyrène + salicylate) par rapport à SPG (bactéries sélectionnées avec pyrène + gazoil). Il en est de même pour la métabolisation des exsudats racinaires de MxG, rejoignant donc les résultats*

obtenus avec les cultures mixtes issues des souches pré-sélectionnées. Etant donné la similitude des profils de dégradation entre [LPP, LPS] et [SPP, SPS], on pourrait supposer que l'évolution des systèmes pour ces deux dernières cultures mixtes tende également vers la confirmation de la biostimulation de la dégradation des HAP en présence d'exsudats à long terme (80 jours).

En résumé, l'ensemble des tests en microplaques avec exsudats totaux de MxG ont suggéré i) un lien direct entre les exsudats et la stimulation de la dégradation des HAP par co-métabolisme, ii) entraînant une augmentation sélective des communautés bactériennes dégradantes.

### III.1.3.3. Effets des exsudats totaux sur des suspensions-dilutions de sols : tests à partir des deux types de sols contaminés H2 et M2

L'effet de l'ajout des exsudats totaux de MxG a ensuite été testé sur des suspensions-dilutions directement issues des deux sols de friches pollués retenus pour les expérimentations *in situ* (Figure 33). Il s'agissait plus précisément du second sol majoritairement contaminé en HAP (H2), et du sol à contamination « mixte » HAP-métaux (M2), à teneurs moins importantes en HAP mais plus élevées en éléments métalliques (III.1.1). Ces expériences visent à vérifier les possibilités de biostimulation spécifique des communautés dégradantes *in situ*. Elles constituent ainsi une approche « à mi-chemin » entre les tests sur cultures mixtes de sol de friche réalisés *in vitro* et des essais de remédiation par culture directe de MxG en sol.

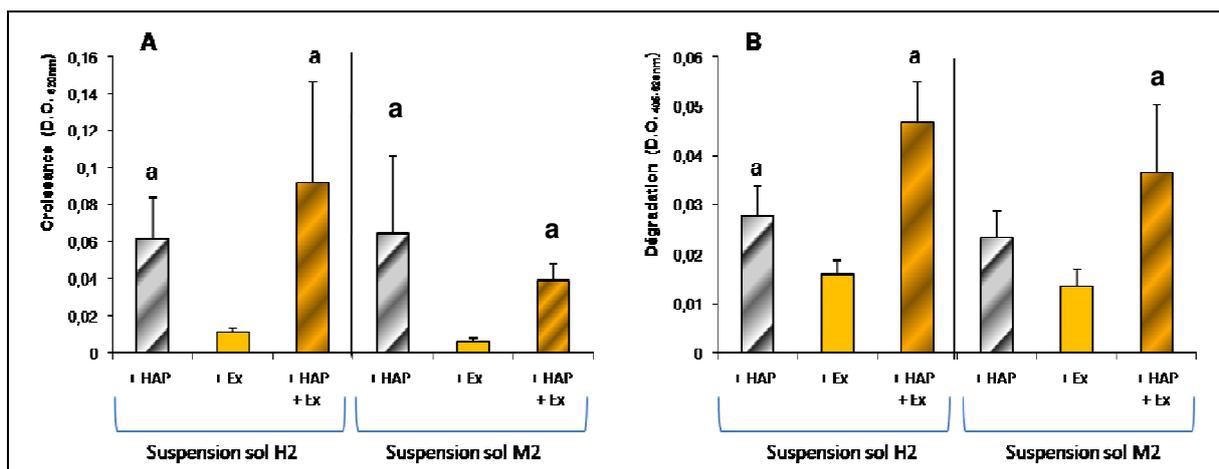
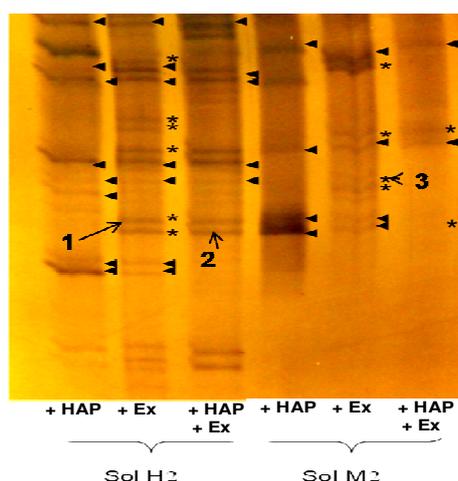


Figure 33 : Effets comparatifs à moyen terme de la présence de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux : A) sur la croissance bactérienne, B) sur l'activité globale de dégradation, mesurées après 45 jours de culture à partir de suspensions bactériennes issues des sols de friche H2 et M2. Des suspensions-dilutions des deux sols ont été réalisées et 25  $\mu$ L des dilutions au 1/1000<sup>ème</sup> ont été ensemencées en tant qu'inoculum bactérien à  $t_0$  (modification non significative de l'absorbance du milieu à 620 nm). Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 12$ ). Différences significatives indiquées par « a » par rapport à la modalité [+ exsudats].

L'évolution de la biomasse des suspensions microbiennes suit le même profil pour les deux sols (Figure 33, A). Une augmentation significative de la croissance est observée dans chaque cas en présence de HAP et des [exsudats + HAP] par rapport à la présence d'exsudats uniquement (Figure 33, A : a :  $p < 0,05$ ). L'analyse de l'activité globale de dégradation témoigne de la métabolisation des exsudats par les suspensions bactériennes issues des deux sols (Figure 33, B). Les HAP semblent cependant constituer la source de carbone préférentiellement utilisée par les microorganismes dans ce sol à contamination majeure en HAP (Figure 33, B : a :  $p < 0,05$ ). En revanche, en situation de sol faiblement contaminé en HAP (sol M2), l'impact des exsudats est plus marqué en présence simultanée de HAP, indiquant une dégradation des deux composés (Figure 33, B : a :  $p < 0,05$ ). Dans ce dernier cas, où la fréquence des gènes de biodégradation peut être mesurée à un niveau basal au sein des communautés bactériennes en raison du faible niveau de pollution (25 mg HAP totaux/kg sol sec), la biostimulation de la dégradation par co-métabolisme exsudats-HAP pourrait constituer un phénomène plus marqué dans l'adaptation fonctionnelle des communautés bactériennes. En outre, l'apport de carbone *via* les exsudats racinaires pourrait représenter un apport énergétique supplémentaire dans la résistance face aux métaux présents.

Afin de vérifier la présence de souches bactériennes impliquées dans la dégradation des HAP après ajout des exsudats racinaires, l'analyse de la diversité bactérienne des cultures-suspension de sols a été réalisée par méthode PCR-TTGE (Muyzer et al., 1993) (Figure 34).



**Figure 34 : Profils de diversité des souches majoritaires des suspensions-dilutions de sols H2 et M2 après incubation (durant 45 jours en milieu minimum) en présence de HAP, des exsudats totaux de MxG ou de la combinaison des deux.** 40  $\mu$ L de suspension bactérienne prélevée dans tous les puits de chacune des modalités de culture réalisées en microplaques ont été mélangés, l'ADN génomique extrait et la région V3 des ADNr 16S amplifiés par PCR, suivi de la séparation des amplicons par TTGE. \* : souches mises en évidence après croissance en présence des exsudats de MxG; pointes de flèche : souches mises en évidence en présence des HAP et retrouvées en présence des exsudats; 1, 2, 3 : souches séquencées.

Certaines souches probablement impliquées dans la dégradation des polluants (indiquées par des pointes de flèche) ont également été retrouvées parmi les souches majoritaires spécifiquement après croissance avec exsudats racinaires (Figure 34). D'autres ont été stimulées par l'apport des exsudats racinaires (Figure 34, indiquées par \*) ; certaines se maintenant également en présence de HAP (bandes n° 1 et 2, Figure 34). Pour le sol à pollution « mixte » M2, la contamination en métaux à des concentrations beaucoup plus élevées (IV.1.1 p149), impose une contrainte supplémentaire (toxicité), se traduisant notamment par des souches différentes (d'après les distances de migration sur gel) potentiellement adaptées à la pollution organo-minérale (Arnebrant et al., 1987; Ríha et al., 1993; Sokhn et al., 2001). Là encore, l'ajout d'exsudats tend à favoriser l'émergence de certaines souches bactériennes (Figure 34, indiquées par \*). Trois bandes de TTGE (numérotées 1 à 3) ont pu être réamplifiées et séquencées pour identification des populations bactériennes potentiellement associées à la présence des exsudats (ADNr 16S, Tableau 22).

**Tableau 22 : Affiliation phylogénétique des bactéries des suspensions de sols H2 et M2, basée sur l'analyse des séquences géniques d'ADNr 16S (réamplifiés à partir des bandes de TTGE numérotées à la Figure 34).**

Bande TTGE	Classification phylogénétique	Identification RDP	Séquence homologue la plus proche
1	<i>Acidobacteria</i>	S000023342	<i>unidentified Acidobacteria_Gp1</i>
2	<i>γ proteobacteria</i>	S000871634	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
3	<i>γ proteobacteria</i>	S001450603	<i>uncultured Pseudomonas sp.</i>

Ces trois phylotypes s'apparentent à des genres bactériens très répandus dans les sols et témoignant généralement d'une grande versatilité dans la dégradation des composés organiques : *Acidobacteria* et *Pseudomonas* (Quaiser et al., 2003). La souche 1 serait apparentée à une bactérie isolée dans une région géographique très proche (nord de l'Allemagne). De plus, les milieux d'isolement d'origine des souches référencées pour 1 (tourbière, zone riche en fragments végétaux dont la lignine) et 3 (sable pollué par du pétrole brut) tendent à confirmer la capacité de dégradation des composés aromatiques de ces souches. *Pseudomonas alcaligenes*, isolée à partir de la rhizosphère de bananier, indiquerait aussi l'effet de la biostimulation des exsudats racinaires de MxG sur les bactéries rhizosphériques.

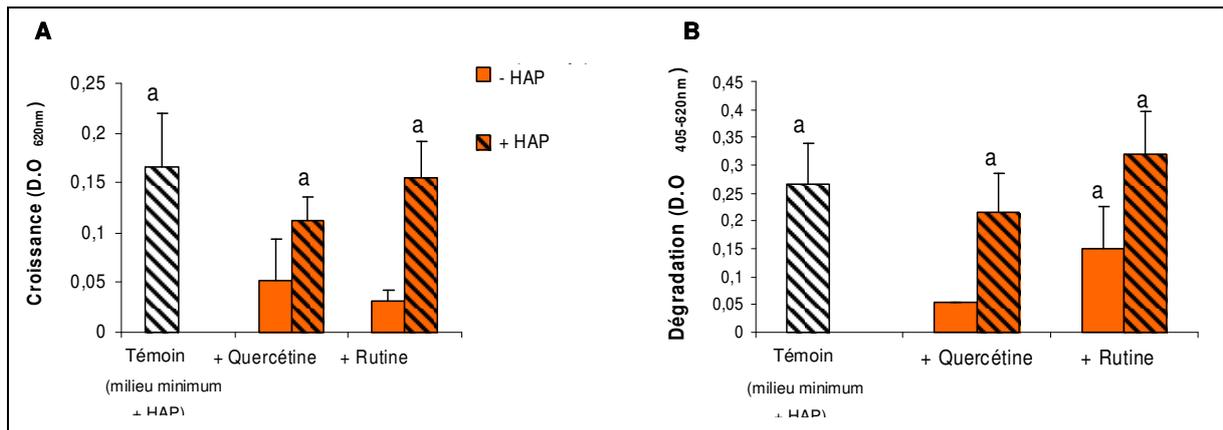
*Globalement, les résultats obtenus à partir de suspensions bactériennes de sol confortent l'hypothèse de la stimulation de certaines souches à capacité de dégradation par co-métabolisme émise lors des précédents tests en microplaques avec les cultures mixtes LP, LPP et LPS d'une part ainsi que SP et SPP d'autre part. Cet enrichissement sélectif pourrait être dû à la capacité de certaines souches à utiliser des métabolites secondaires contenus dans les exsudats comme les travaux de Fletcher & Hegde (1995) ainsi que Krutz et collaborateurs (2005) l'ont suggéré. Par ailleurs, d'autres souches présentes dans le sol mais non liées à la dégradation des HAP (parmi celles indiquées par \*), répondent aussi à la stimulation via l'ajout d'exsudats; ce qui peut également être mis en relation avec les résultats obtenus en microplaques avec les cultures mixtes LPG et SPG, à savoir un enrichissement non spécifique de certaines souches, dû à la présence de composés rapidement assimilables autre que ceux à structure aromatique (tels que sucres, acides aminés).*

#### ***III.1.3.3.4. Etude des effets des métabolites secondaires polycycliques majoritaires : quercétine et rutine***

Des investigations complémentaires ont été menées dans le but d'identifier, parmi les différentes molécules à structure aromatique des exsudats de MxG, celles qui seraient impliquées dans la biostimulation sélective des communautés dégradantes.

#### **Effets de la quercétine et de la rutine en présence du mélange de HAP (phénanthrène, fluorène, pyrène et fluoranthène) (Técher et al., 2010)**

Suite à l'identification de la quercétine et de la rutine parmi les molécules polyphénoliques majeures des exsudats racinaires de MxG, des tests de biostimulation avec ces deux composés ont été réalisés avec LP (Figure 35). Cette culture mixte a été choisie car elle témoignait de la réponse moyenne la plus favorable en termes de biodégradation des HAP seuls sur une période d'incubation de 45 jours (Figure 29).



**Figure 35 : Effets comparatifs à moyen terme (45 jours) de l'ajout de quercétine ou de rutine (dissous dans l'eau) : A) sur la croissance bactérienne, B) sur l'activité globale de dégradation, en présence ou non du mélange des 4 HAP (pyrène, fluoranthène, phénanthène et fluorène), évalués après incubation de la culture mixte LP en milieu minimum. Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 8$ ). Différences significatives indiquées par des lettres minuscules par rapport à la modalité [+ bactéries en présence de rutine (A) ou quercétine (B)].**

Les résultats illustrés à la figure 35 témoignent d'une part de la capacité des bactéries de la culture mixte LP à partiellement dégrader et assimiler la quercétine et la rutine comme substrat de croissance. D'autre part, les différences d'absorbances relevées pour ces molécules indiquent qu'elles sont susceptibles de faire effectivement partie de la fraction aromatique des exsudats essentiellement dégradée par les bactéries capables de croître uniquement à partir des HAP comme substrat de croissance. La rutine semble produire des métabolites de dégradation plus stables en solution que ceux de la quercétine (Figure 35, B : a :  $p < 0,05$ ). Cette molécule étant un rhamnoglucoside de la quercétine, on pourrait supposer que l'assimilation préférentielle des deux groupements osidiques de la molécule favorise la rémanence de certains métabolites intermédiaires (Justesen et al., 2000). LP contient des souches proches d'*Enterobacteriaceae AcOx31A* (Tableau 20). Certaines entérobactéries ne sont capables de dégrader que la partie osidique de la rutine (Justesen et al., 2000).

La production de biomasse en présence de HAP seuls, [HAP + rutine] ou [HAP + quercétine] ne témoigne pas de différence significative entre ces trois modalités (Figure 35, A). Elles ne sont notées que par rapport à la présence uniquement de quercétine ou de rutine (Figure 35, A : a :  $p < 0,05$ ). Il en est de même pour les différences d'absorbance (D.O. 405-620nm) (Figure 35, B : a :  $p < 0,05$ ).

***La présence des HAP semble déterminante à la fois dans la production de biomasse et dans l'activité de dégradation observable à l'échelle in vitro, bien que les bactéries dégradantes soient capables de métaboliser la quercétine et la rutine contenues dans les exsudats de MxG.***

## Effets de la rutine en présence de chacun des quatre HAP : le fluorène, le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène (culture sur 45 jours)

Des tests ont été poursuivis avec la rutine, témoignant de l'activité de dégradation moyenne la plus importante en présence du mélange des 4 HAP (Figure 35, B), afin de vérifier si elle ne favoriserait pas la biostimulation de la dégradation d'un HAP en particulier (Figure 36).

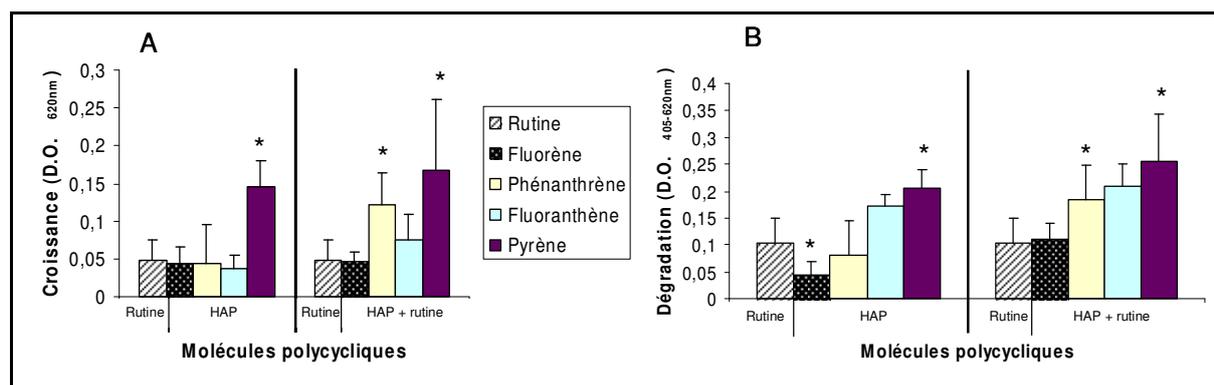


Figure 36 : Effets comparatifs à moyen terme (45 jours) de l'ajout de rutine : A) sur la croissance bactérienne, B) sur l'activité globale de dégradation, en présence ou non de fluorène, de phénanthrène, de fluoranthène ou de pyrène, évalués après incubation de la culture mixte LP en milieu minimum. Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 6$ ). Différences significatives indiquées par \* : par rapport à la modalité rutine (sans HAP).

De manière générale, ces essais ont permis de vérifier que chacun des quatre HAP utilisés en mélange durant les tests sont métabolisés et assimilés en tant que source de carbone et d'énergie par les bactéries dégradantes (Figure 36, A et B), avec une augmentation de biomasse significative en présence de pyrène (Figure 36, A : \* :  $p < 0,05$ ). Cette croissance bactérienne est liée à une dégradation significative du composé (Figure 36, B : \* :  $p < 0,05$ ). Ce résultat s'explique par le fait que ces bactéries ont été initialement sélectionnées pour leur capacité à croître à partir du pyrène comme unique source de carbone.

En présence de phénanthrène ou de pyrène supplémenté en rutine, on observe une augmentation significative de croissance par rapport au milieu contenant uniquement de la rutine (Figure 36, A : \* et a :  $p < 0,05$ ). Cette production accrue de biomasse indique donc l'assimilation partielle de ces HAP en présence du flavonoïde, confirmé par les activités de dégradation (Figure 36, B : [HAP+rutine] : \* :  $p < 0,05$ ).

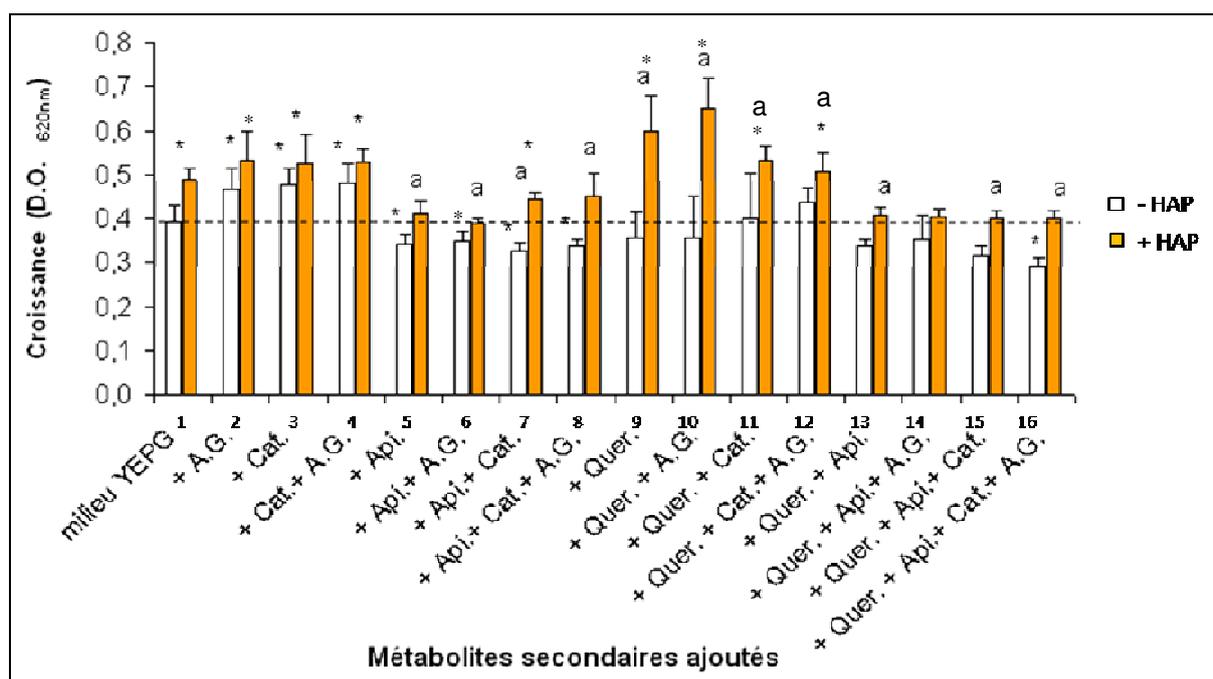
*En présence de phénanthrène ou de pyrène, la rutine permet un développement des populations bactériennes dégradantes. Toutefois, de même qu'avec la quercétine, sa contribution dans la biostimulation de la dégradation semble limitée sur la durée*

*considérée. Etant donné la diversité des composés aromatiques mis en évidence dans les exsudats de MxG (III.1.2) et la complexité des processus de co-métabolisme (liés à la diversité des bactéries dégradantes et des voies de dégradation des HAP), d'autres métabolites secondaires sont également susceptibles de participer à la biostimulation des cultures mixtes dégradantes.*

#### ***III.1.3.3.5. Evaluation en plans complets des effets des quatre métabolites secondaires majoritaires des exsudats de MxG en milieux de culture riche et minimum***

Des tests ont été poursuivis en combinant la présence de quatre des métabolites secondaires identifiés : l'acide gallique (A.G.), la catéchine (Cat.), l'apigénine (Api.) et la quercétine (Quer.), apporté chacun à la concentration finale de 17,22 mM (correspondant à une solution mère de catéchine à 5 mg/mL en comparaison à la suspension d'exsudats totaux à 10 mg/mL). Les premières molécules (acide gallique et catéchine) ont été choisies en tant que molécules partiellement similaires à des intermédiaires métaboliques inductibles des voies enzymatiques de dégradation des HAP (souvent à structure monocyclique comme l'acide gallique) (Chen & Aitken, 1998), et les secondes (apigénine et quercétine) pour leur structure polycyclique rappelant directement celle des polluants. Les tests ont été réalisés avec les cultures mixtes LP et SPP. De la même manière qu'avec les exsudats totaux de MxG, les incubations ont été réalisées en milieu riche YEPG (dilué au 1/10<sup>ème</sup>, 6 jours d'incubation) et en milieu minimum de Buschnell-Hass (45 jours d'incubation).

## Incubation en milieu riche : culture mixte LP



**Figure 37 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique (A.G.), de catéchine (Cat.), d'apigénine (Api.) et de quercétine (Quer.), seuls ou en combinaison, sur la croissance (6 jours) de la culture mixte LP en milieu riche. Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 6$ ). Différences significatives entre les groupes indiquées par : \* : par rapport à la modalité témoin [milieu minimum - HAP], a : par rapport à la modalité homologue sans HAP.**

En absence de HAP, l'ajout d'acide gallique, de catéchine ou de la combinaison des deux entraîne une augmentation de croissance significative par rapport au témoin [milieu YEPG] (Figure 37, n° 2, 3 et 4, \* :  $p < 0,05$ ). Ces molécules fournissent une source de carbone supplémentaire directement assimilable par les bactéries. En revanche, l'ajout d'apigénine dans les quatre modalités suivantes s'accompagne systématiquement d'une diminution significative de la biomasse produite (Figure 37, n° 5, 6, 7 et 8 \* :  $p < 0,05$ ), suggérant un effet toxique de cette molécule.

La quercétine à elle seule n'a pas d'impact sur la croissance bactérienne (Figure 37, n° 9, \* :  $p < 0,05$ ). L'étude du potentiel allélopathique de cette molécule ainsi que de son dérivé diglycosidique la rutine par Averett et collaborateurs (1978) n'avaient pas révélé d'effet antimicrobien sur la microflore du sol ni d'entérobactéries. Par contre, là-encore, l'ajout d'apigénine diminue la production de biomasse dans trois des quatre dernières modalités de culture (Figure 37, n° 9, 11 et 12, \* :  $p < 0,05$ ). Ce composé semble témoigner d'un pouvoir bactériostatique voire d'une toxicité potentielle comme indiqué dans la littérature (Akroum et al., 2010).

L'ajout de HAP entraîne une augmentation significative de la biomasse produite dans 9 des 16 modalités d'incubation par rapport au témoin YEPG sans HAP (Figure 37, n° 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11 et 12, \* :  $p < 0,05$ ). De plus, les hydrocarbures permettent une production de biomasse plus importante dans 11 des 16 modalités de culture avec HAP que dans leur homologue sans HAP malgré la présence d'apigénine (Figure 37, n° 5 à 13, 15 et 16, a :  $p < 0,05$ ). Par conséquent, les HAP sont probablement assimilés en tant que source de carbone pour la croissance bactérienne. Par ailleurs, on constate que la présence combinée de catéchine et d'acide gallique (+ HAP, n°4), ou de quercétine et d'acide gallique (+ HAP, n°10) ne conduit pas à une augmentation de biomasse plus importante que celle observée en présence de catéchine ou de quercétine seule (Figure 37). De fait, on observe que la production de biomasse la plus importante est essentiellement réalisée en présence de quercétine seule ou combinée à l'acide gallique (Figure 37) pour la culture mixte LP. Les molécules testées seraient donc davantage impliquées dans des phénomènes d'induction de la dégradation (notamment par co-métabolisme) des composés cycliques présents que comme source de carbone uniquement.

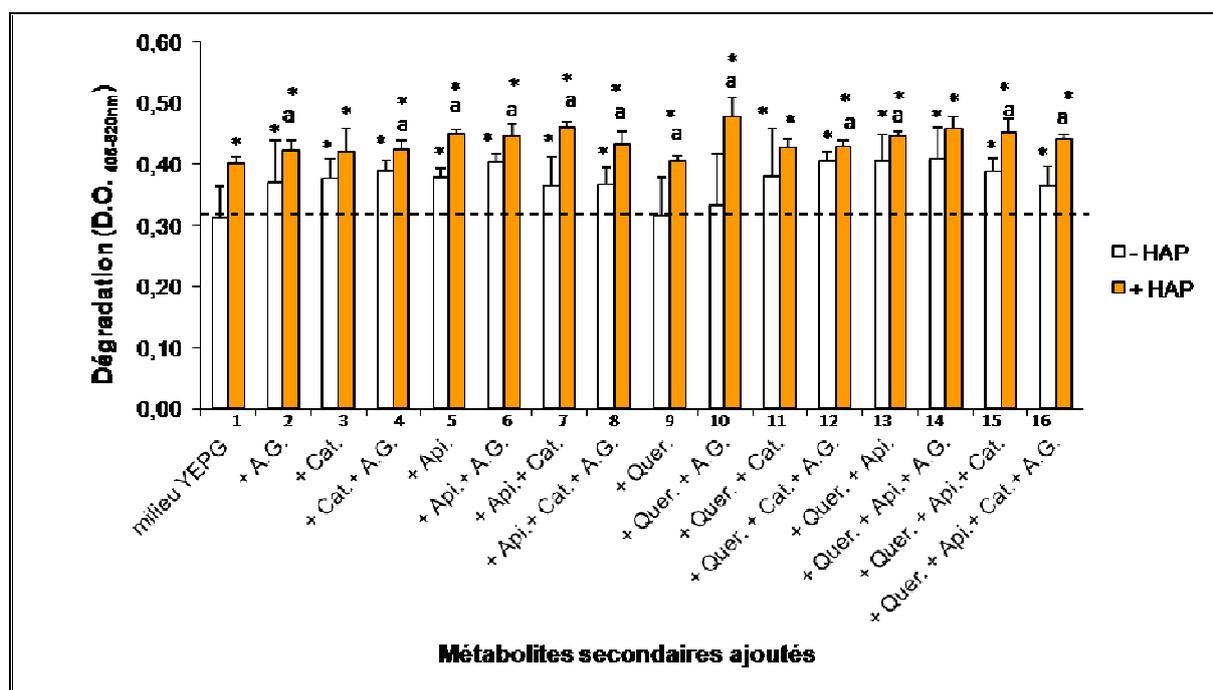


Figure 38 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique (A.G.), de catéchine (Cat.), d'apigénine (Api.) et de quercétine (Quer.), seuls ou en combinaison, sur l'activité globale de dégradation (6 jours) par la culture mixte LP en milieu riche. Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 6$ ). Différences significatives entre les groupes indiquées par : \* : par rapport à la modalité témoin [milieu minimum - HAP], a : par rapport à la modalité homologue sans HAP.

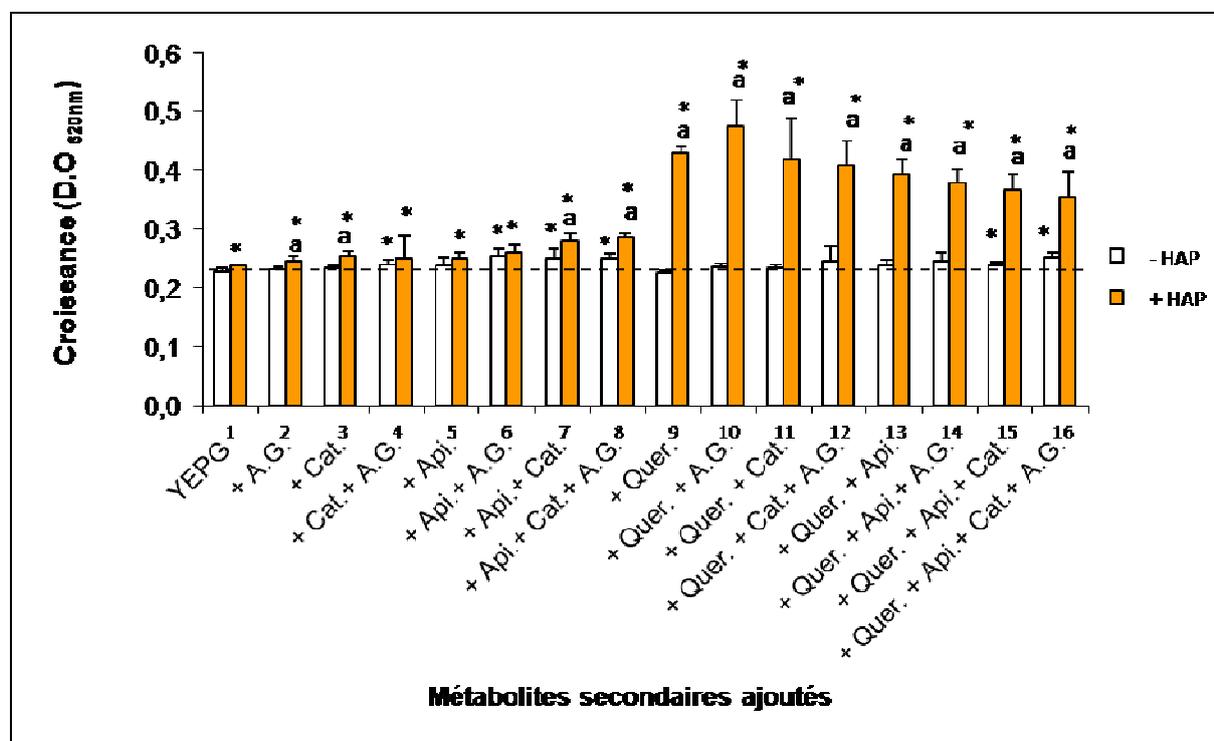
L'utilisation des différentes molécules en présence a également été appréhendée par mesures d'absorbance (D.O. 405-620 nm) (Figure 38). Dans 13 des 15 modalités de culture en

absence de HAP, l'acide gallique, l'apigénine, la catéchine et la quercétine sont donc partiellement dégradées par les bactéries (Figure 38, n° 2 à 8, 11 à 16, \* :  $p < 0,05$ ). Toutefois, en présence de quercétine seule [+ Quer.] et [+ Quer. + A.G.], aucune différence significative n'est notée (Figure 38, n° 9 et 10). L'ajout des HAP entraîne une augmentation significative des absorbances dans toutes les modalités par rapport au témoin YEPG (Figure 38, \* :  $p < 0,05$ ) et par rapport aux modalités homologues sans HAP (Figure 38, n° 2, 4 à 10, 12, 13, 15, 16, a :  $p < 0,05$ ). Ces résultats confirment la biodégradation et l'assimilation partielle des polluants pour la production de biomasse comme précédemment énoncée (Figure 38).

*En résumé, en l'absence de HAP, on note un effet promoteur de l'acide gallique et de la catéchine sur la croissance bactérienne. Au contraire, l'apigénine semble exercer une toxicité alors que la quercétine est sans effet notable sur la production de biomasse. Les différents profils de croissance sont directement liés à la dégradation de chacun des composés en présence. En outre, les quatre métabolites secondaires n'empêchent pas la dégradation des HAP. Cette dernière est plus marquée en présence de quercétine et de [quercétine + acide gallique]. Ce mélange paraît le plus « efficace » à la fois en termes de biostimulation de la croissance et de la dégradation des HAP.*

### Incubation en milieu riche : culture mixte SPP

Afin de vérifier si les effets prépondérants des combinaisons [quercétine] et [quercétine + acide gallique] peuvent être « étendus » aux bactéries du sol de friche (H1), des tests en microplaques ont été conduits avec la culture mixte SPP selon les mêmes modalités (Figure 39).

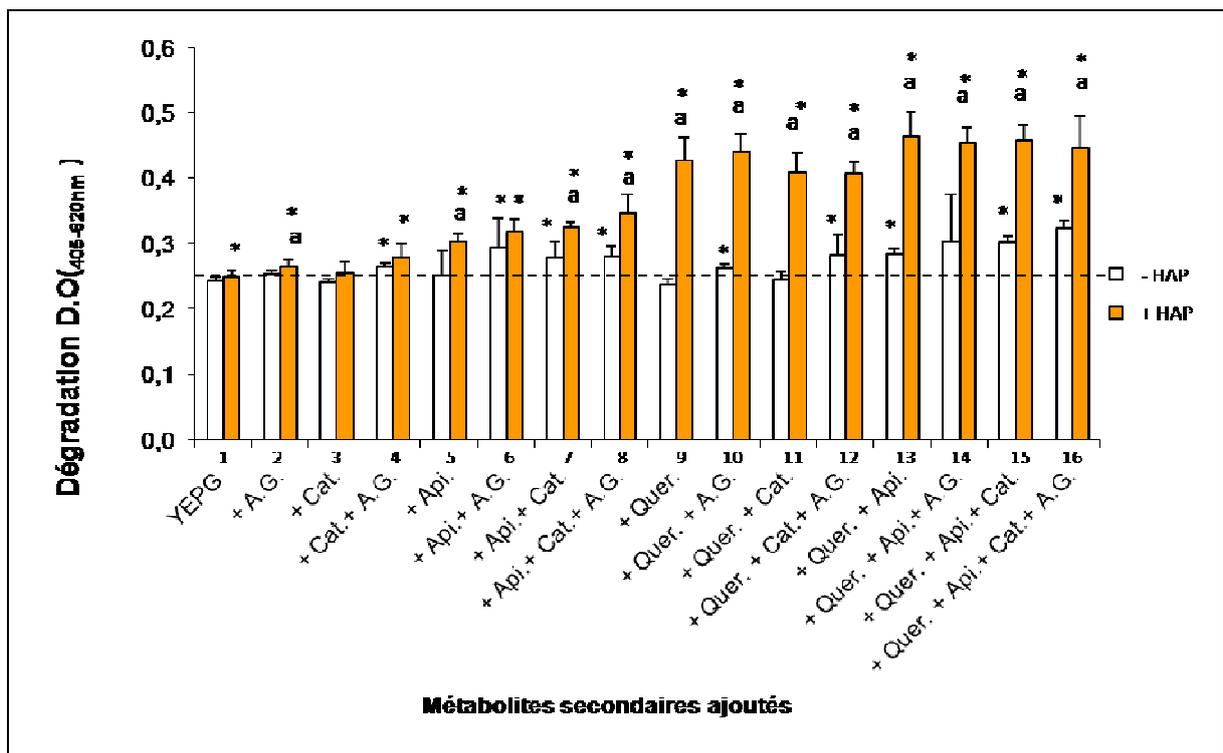


**Figure 39 :** Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique (A.G.), de catéchine (Cat.), d'apigénine (Api.) et de quercétine (Quer.), seuls ou en combinaison, sur la croissance (6 jours) de la culture mixte SPP en milieu riche. Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 6$ ). Différences significatives entre les groupes indiquées par : \* : par rapport à la modalité témoin [milieu minimum - HAP], a : par rapport à la modalité homologue sans HAP.

Pour ce *consortium*, l'ajout de polyphénols uniquement entraîne peu de variation de croissance par rapport au milieu témoin YEPG (Figure 39). Une augmentation sensible mais significative de la production de biomasse est ainsi mesurable en présence de catéchine et d'acide gallique (n° 4), d'apigénine et d'acide gallique (n° 6), d'apigénine et catéchine (n° 7), ou des trois composés (Figure 39, n° 8, \* :  $p < 0,05$ ). Contrairement à LP, l'ajout de quercétine (en absence de HAP) n'entraîne d'augmentation de croissance qu'en combinaison avec l'apigénine et la catéchine, ou l'apigénine avec la catéchine et l'acide gallique, supposant davantage une utilisation des trois dernières molécules que de la quercétine elle-même (Figure 39, n° 15 et 16 respectivement, \* :  $p < 0,05$ ).

En présence de HAP, on observe une augmentation significative de la biomasse bactérienne par rapport au témoin YEPG et/ou aux modalités homologues sans HAP (Figure

39, a et \* :  $p < 0,05$ ), excepté en présence de catéchine seule (n° 3). Ces résultats confirment de la même manière qu'avec LP l'assimilation des HAP en tant que substrats de croissance microbienne. De plus, suite à l'ajout des HAP, l'augmentation de croissance est clairement marquée pour toutes les modalités de culture préalablement supplémentées en quercétine (Figure 39, n° 9 à 16). Ce résultat, appuyé par ceux mis en évidence avec LP (Figure 39, n° 9 et 10), indiquerait que la quercétine est le principal facteur favorisant la croissance bactérienne en présence de HAP. Les mesures relatives à la dégradation globale des différents composés en présence sont illustrées à la figure 40.



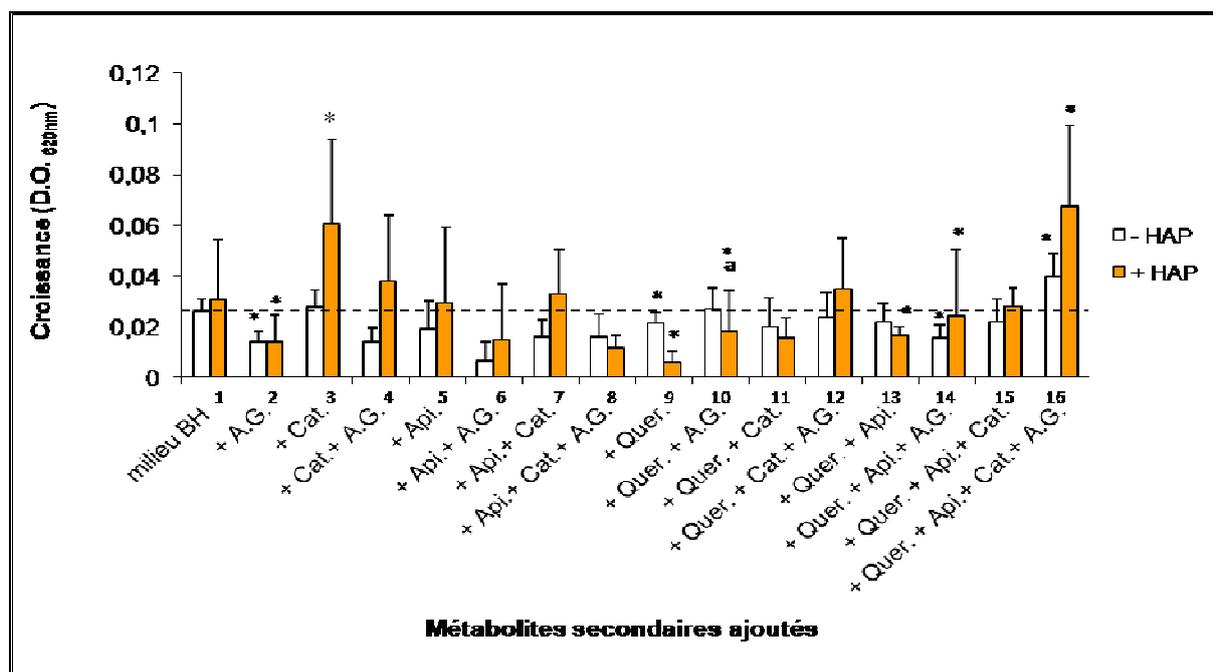
**Figure 40 :** Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique (A.G.), de catéchine (Cat.), d'apigénine (Api.) et de quercétine (Quer.), seuls ou en combinaison, sur l'activité globale de dégradation (6 jours) par la culture mixte SPP en milieu riche. Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 6$ ). Différences significatives entre les groupes indiquées par : \* : par rapport à la modalité témoin [milieu minimum - HAP], a : par rapport à la modalité homologue sans HAP.

L'analyse des divers milieux de culture indique des différences d'absorbance significatives par rapport au témoin YEPG essentiellement dues à l'ajout d'acide gallique en l'absence des HAP (Figure 40, n° 2, 4, 6, 10 et 16, \* :  $p < 0,05$ ). En outre, la dégradation des HAP est confirmée de manière générale avec des augmentations d'absorbance significatives par rapport au témoin et dans la majorité des cas par rapport aux modalités homologues sans HAP (Figure 40, \* et a :  $P < 0,05$ ). La biodégradation plus importante des HAP en présence de quercétine est de plus confirmée (Figure 40, n° 9 à 16).

*Pour les bactéries issues du sol de friche, l'impact majoritaire résulte également de l'ajout de la quercétine en présence de HAP, à la fois dans la croissance (où la combinaison [+ quercétine + acide gallique] se démarque à nouveau) et dans l'activité de dégradation. En résumé, en milieu riche, la quercétine, en particulier lorsqu'elle est combinée à l'acide gallique, constituerait le co-métabolite de dégradation le plus efficace parmi les différentes molécules testées.*

### **Incubation en milieu minimum : culture mixte LP**

Les effets des 4 métabolites secondaires retenus pour les essais en milieu riche (simulant les conditions nutritives au niveau rhizosphérique) ont été reconduits en milieu minimum, simulant cette fois les conditions nutritives en sol non planté. Le sol étant souvent considéré comme un milieu oligotrophe (Johnsen et al., 2005), l'intérêt supplémentaire réside ici dans la mise en évidence d'une combinaison efficace de molécules pour la biostimulation de la dégradation en environnement contaminé non rhizosphérique.

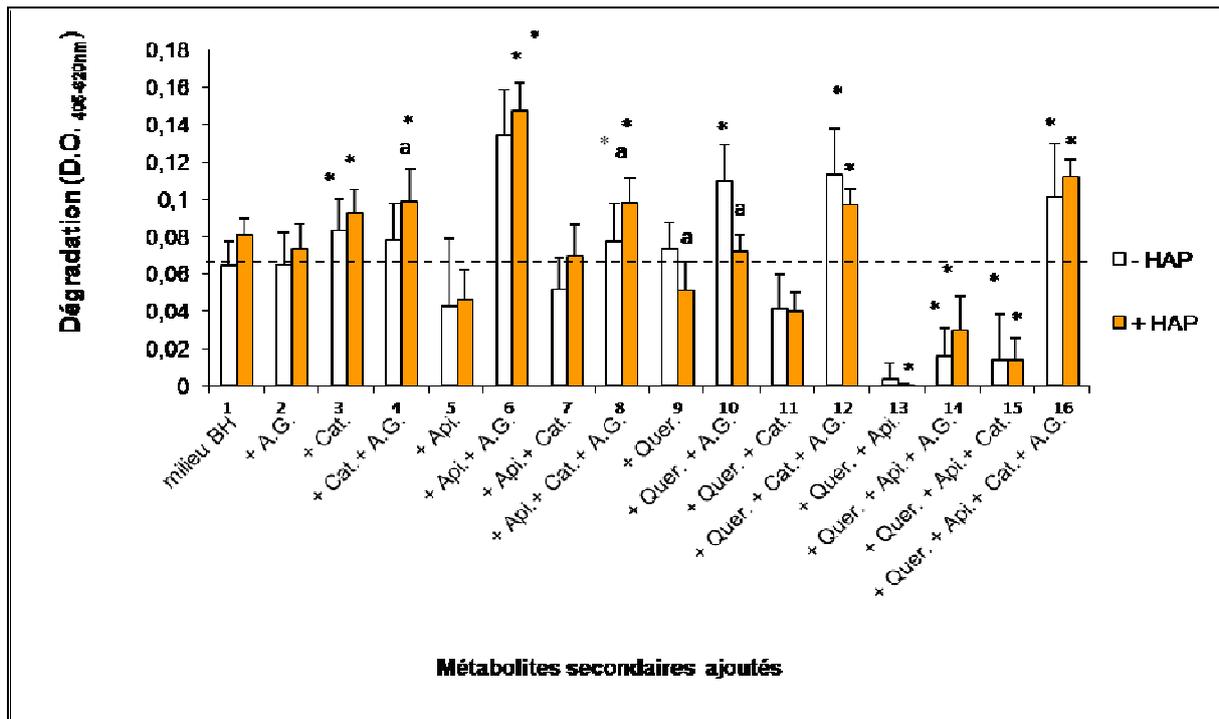


**Figure 41 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique (A.G.), de catéchine (Cat.), d'apigénine (Api.) et de quercétine (Quer.), seuls ou en combinaison, sur la croissance (45 jours) de la culture mixte LP en milieu minimum. Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 6$ ). Différences significatives entre les groupes indiquées par : \* : par rapport à la modalité témoin [milieu minimum - HAP], a : par rapport à la modalité homologue sans HAP.**

En milieu minimum (milieu BH, Figure 41), la biomasse bactérienne se maintient pendant les 45 jours d'incubation probablement grâce au carbone du méthanol employé pour la préparation des solutions de flavonoïdes.

Dans la plupart des modalités d'incubation, la quantité de polyphénols apportée est insuffisante pour permettre une croissance bactérienne significativement plus importante que dans le témoin (milieu BH). L'ajout d'acide gallique seul ou de quercétine éventuellement combinée à l'apigénine et à l'acide gallique témoigne d'un déclin significatif de la biomasse microbienne (Figure 41, n° 2, 9, 13 et 14 respectivement, \* :  $p < 0,05$ ). L'ajout de catéchine à ce dernier mélange permet une augmentation significative de la croissance bactérienne par rapport à la modalité témoin milieu BH (Figure 41, n° 15, \* :  $p < 0,05$ ). En l'absence d'autres composés organiques, l'ajout de catéchine, molécule à faible poids moléculaire et à plus grande solubilité comparée à la quercétine ou l'apigénine, constitue une source de carbone supplémentaire utilisable pour la croissance bactérienne.

Dans le milieu BH seul, l'ajout des HAP n'est pas suffisant pour entraîner une augmentation de biomasse significative par rapport au témoin (Figure 41). De même, pour les milieux supplémentés en HAP en présence d'acide gallique, de quercétine, de quercétine et acide gallique, de quercétine et d'apigénine, ou de [quercétine + apigénine + acide gallique], la biomasse mesurée sur la durée d'incubation considérée demeure significativement inférieure au témoin (Figure 41, n° 2, 9, 10, 13 et 14 respectivement, \* :  $p < 0,05$ ). Seul l'ajout supplémentaire de catéchine permet une augmentation de croissance significative en présence de HAP et des polyphénols (Figure 41, n° 16, \* :  $p < 0,05$ ).



**Figure 42 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique (A.G.), de catéchine (Cat.), d'apigénine (Api.) et de quercétine (Quer.), seuls ou en combinaison, sur l'activité globale de dégradation (45 jours) par la culture mixte LP en milieu minimum. Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 6$ ). Différences significatives entre les groupes indiquées par : \* : par rapport à la modalité témoin [milieu minimum - HAP], a : par rapport à la modalité homologue sans HAP.**

L'ajout de catéchine uniquement entraîne une différence de D.O.  $_{405-620\text{ nm}}$  plus marquée dans le milieu de culture (Figure 42, n° 3, \* :  $p < 0,05$ ). Il en est de même pour l'acide gallique en présence simultanée d'apigénine, d'apigénine et de catéchine, de quercétine, de quercétine et de catéchine, et de [quercétine + apigénine + catéchine] (Figure 42, n° 6, 8, 10, 12 et 16, \* :  $p < 0,05$ ). L'acide gallique pourrait être une des principales molécules responsables de l'augmentation de densité optique des milieux à la suite de la dégradation partielle des exsudats de MxG.

L'ajout des HAP entraîne une activité de dégradation significativement plus marquée en présence de [catéchine + acide gallique] et de [apigénine + catéchine + acide gallique] par rapport à leur homologue sans HAP (Figure 42, n° 4 et 8, \* :  $p < 0,05$ ). Cela indiquerait une biodégradation partielle des HAP dans ces modalités et expliquerait l'augmentation de biomasse significative relevée à la Figure 41. En revanche, les combinaisons [quercétine] et [quercétine + acide gallique] induisent une diminution globale d'activité de dégradation par rapport aux modalités sans HAP (Figure 42, n° 9 et 10, \* :  $p < 0,05$ ). L'ajout des autres polyphénols à la quercétine, *i.e.* apigénine et catéchine seuls ou combinés à l'acide gallique, se révèle sans effet significatif sur la dégradation globale des composés en présence de HAP (Figure 42).

Les tests en milieu minimum révèlent la complexité des effets résultant des interactions entre métabolites secondaires. La variabilité observée dans les différentes modalités de culture suggère d'augmenter le nombre de réplicats (initialement :  $n = 12$ ). Globalement, l'effet promoteur de la catéchine sur la croissance bactérienne est confirmé. En présence de HAP, l'ajout de quercétine tend à diminuer la dégradation globale, un phénomène accentué par l'apigénine mais compensé par l'ajout d'acide gallique. Des investigations supplémentaires relatives à la mesure de l'expression de gènes impliqués dans la dégradation des HAP (tels que des dioxygénases) associée à la quantification des polluants restants permettraient de mieux appréhender les phénomènes mis en jeu.

### Incubation en milieu minimum : culture mixte SPP

Afin de vérifier également les possibilités d'étendre ces résultats aux bactéries issues du sol de friche, les tests de biostimulation de croissance (Figure 43) et de dégradation (Figure 44) ont également été menés avec la culture mixte SPP en milieu minimum.

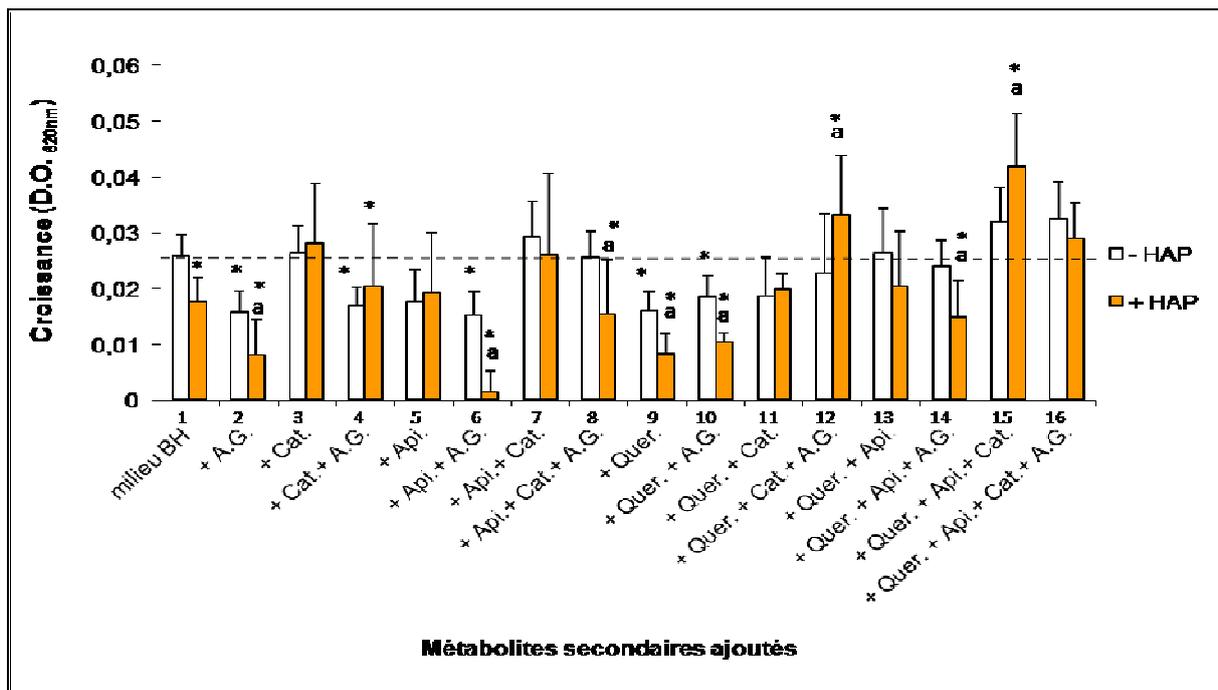


Figure 43 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique (A.G.), de catéchine (Cat.), d'apigénine (Api.) et de quercétine (Quer.), seuls ou en combinaison, sur la croissance (45 jours) de la culture mixte SPP en milieu minimum. Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 6$ ). Différences significatives entre les groupes indiquées par : \* : par rapport à la modalité témoin [milieu minimum - HAP], a : par rapport à la modalité homologue sans HAP.

Pour SPP, en absence de quercétine, la présence d'acide gallique est essentiellement liée à une production de biomasse significativement moins importante par rapport au témoin milieu BH (Figure 43, n° 2, 4 et 6, \* :  $p < 0,05$ ). La situation est similaire en présence

uniquement de quercétine et de [quercétine + acide gallique] (Figure 43, n° 9 et 10, \* :  $p < 0,05$ ).

L'ajout des HAP est lié à une production de biomasse significativement moins importante dans la majorité des cas, à la fois par rapport au témoin (milieu BH) et aux modalités sans HAP (Figure 43, n° 2, 4, 6, 8 à 10, 14, \* :  $p < 0,05$ ). En revanche, en présence de [Quer. + Cat. + A.G.] ou de [Quer. + Api. + Cat.], l'ajout de HAP entraîne une augmentation significative de la biomasse bactérienne (Figure 43, n° 12 et 15, \* et a :  $p < 0,05$ ). De manière générale, la présence de la catéchine lors de l'ajout de HAP permet une production de biomasse plus importante que pour la modalité équivalente sans catéchine (Figure 43). La structure catéchol pourrait stimuler la production de catéchol dioxygénases impliquées dans la biodégradation des HAP.

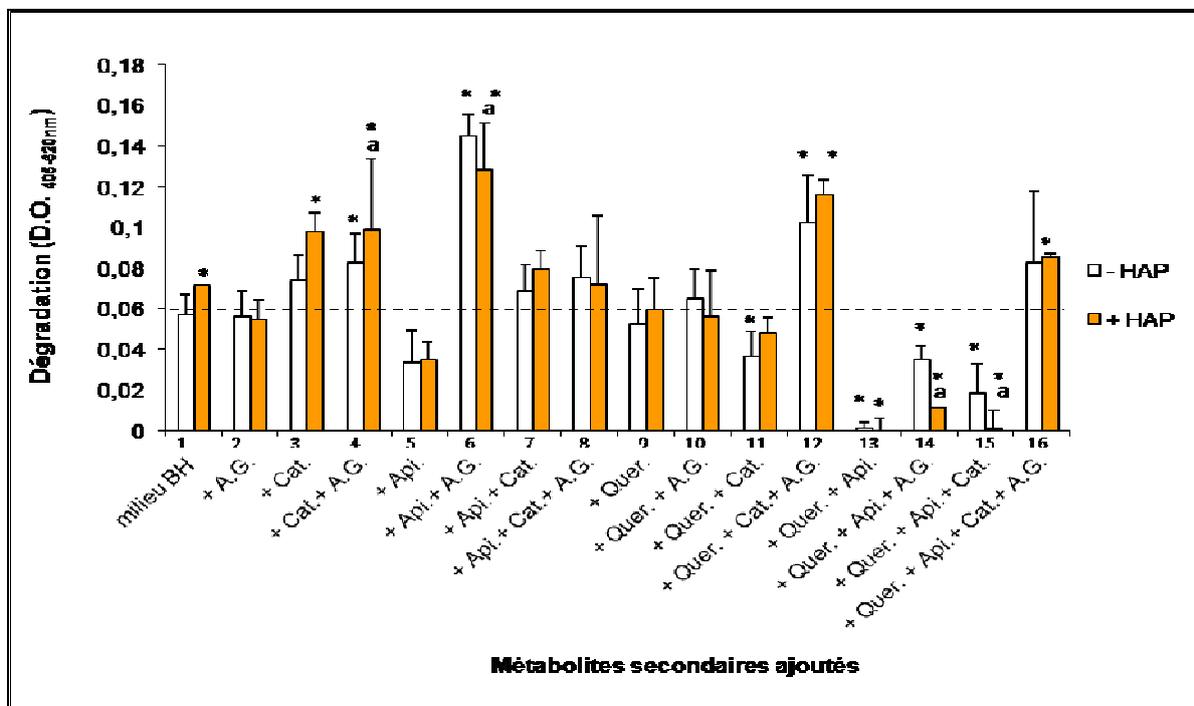


Figure 44 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique (A.G.), de catéchine (Cat.), d'apigénine (Api.) et de quercétine (Quer.), seuls ou en combinaison, sur l'activité globale de dégradation (45 jours) par la culture mixte SPP en milieu minimum. Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 6$ ). Différences significatives entre les groupes indiquées par : \* : par rapport à la modalité témoin [milieu minimum - HAP], a : par rapport à la modalité homologue sans HAP.

Les différences d'absorbances (D.O. 405-620 nm) significativement plus élevées pour les modalités n° 4, 6 et 12 témoignent de la production de métabolites intermédiaires de dégradation en la présence d'acide gallique en particulier (Figure 44, \* :  $p < 0,05$ ). Ces quatre molécules sont en outre métabolisables par les bactéries du sol de friche. Pour ces mêmes modalités, on note une augmentation significative de l'activité de dégradation en présence de

HAP (Figure 44, \* :  $p < 0,05$ ), indiquant également la métabolisation des polluants. Cependant, le fait qu'elle soit liée à une production de biomasse moins importante (Figure 44, \* :  $p < 0,05$ ) indiquerait qu'une part « négligeable » de l'ensemble des composés dégradés serait effectivement assimilée par les bactéries. En absence de quercétine, l'ajout de catéchine ou d'apigénine n'inhibe pas la dégradation des HAP, les différences d'absorbance étant globalement plus élevées avec les polluants (+ HAP) qu'avec les polyphénols seuls (- HAP) (Figure 44, n° 3 et 6, \* et a :  $p < 0,05$ ). Au contraire, en présence de quercétine, supplémenté en apigénine, en apigénine et acide gallique, ou en apigénine et catéchine, on note une diminution significative des différences d'absorbances d'autant plus marqué que des HAP sont ajoutés (Figure 44, n° 13, 14 et 15, \* et a :  $p < 0,05$ ). Cette diminution de l'activité globale de dégradation s'accompagne pourtant d'une production de biomasse identique à celle du témoin milieu BH pour la modalité [Quer. + Api.] voire d'une augmentation de la croissance pour la modalité [Quer. + Api. + Cat.] (Figure 44, n° 13 et 15 respectivement, a :  $p < 0,05$ ). Pour ces trois modalités d'enrichissement en quercétine, la dégradation des composés en présence pourrait avoir conduit à une assimilation plus rapide des molécules dans la biomasse bactérienne.

*Pour les bactéries du sol cultivées en milieu minimum, c'est l'acide gallique (au contraire de l'apigénine pour la culture mixte LP) qui témoigne globalement d'un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. Cet effet est davantage marqué en présence de HAP mais semble compensé par la présence de catéchine (comme observé avec LP). Les profils de dégradation, similaires à ceux précédemment obtenus avec le consortium LP, confirmeraient le rôle stimulateur joué par la quercétine, l'apigénine et la catéchine dans l'augmentation de l'activité de dégradation globale et l'assimilation dans la croissance bactérienne.*

*En résumé, les tests réalisés à la fois sur les cultures mixtes LP et SPP ont témoigné :*

- *d'un effet positif de la quercétine et de la catéchine sur l'activité globale de dégradation des molécules aromatiques; il en ressort notamment que la quercétine stimulerait la biodégradation des HAP par co-métabolisme alors que la catéchine serait davantage impliquée dans le maintien de la biomasse microbienne.*
- *d'un effet bactériostatique de l'apigénine ou de l'acide gallique, variant en fonction des cultures mixtes bactériens et de la présence des autres molécules.*

### III.1.3.3.6. Tests des quatre métabolites secondaires à différentes doses : essais en « Uniform Design »

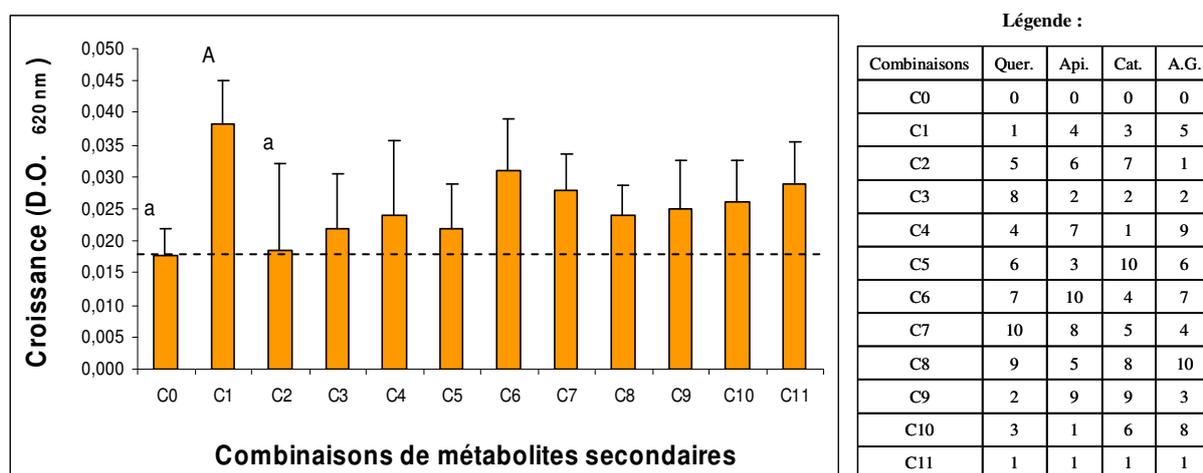
Les tests réalisés en milieu minimum avec des doses équimolaires de quercétine, d'apigénine, de catéchine et d'acide gallique ont témoigné de la difficulté à faire ressortir de manière claire l'influence de chacune des molécules. L'inhibition relative de l'apigénine ou de l'acide gallique sur la croissance et l'activité bactérienne, davantage marquée en présence des HAP, pose la question des interactions entre les différentes molécules au niveau bactérien. De plus, les concentrations en métabolites secondaires synthétisés *in vivo* au niveau racinaire sont sujettes à d'importantes variations sous l'effet des facteurs environnementaux (disponibilité en nutriments, température, pH, interactions avec bactéries et champignons, I.2.3.5.). Par conséquent, l'effet de différentes doses de quercétine, d'apigénine, de catéchine et d'acide gallique a été testé sur la croissance et l'activité de dégradation des cultures mixtes LP et SPP, à la fois en milieu minimum et en présence de HAP. A ces dix combinaisons de concentrations différentes (testées sur la base d'une répartition de type « Uniform design » (UD) – annexe 4) s'ajoutent celles des modalités [témoin croissance avec HAP] (C0) et [mélange équimolaire des quatre métabolites] (C11) des plans complets précédemment analysés (Tableau 23) et réalisés à partir des mêmes préparations d'inocula bactériens aux même moments.

**Tableau 23 : Récapitulatifs : A) des combinaisons C0 à C11 de métabolites secondaires quercétine (Quer.), apigénine (Api.), catéchine (Cat.) et acide gallique (A.G.) testés en mélange à 11 niveaux (ou doses) différents, B) des concentrations en métabolites secondaires (dissous dans 1,4 µL de méthanol) pour chaque niveau (niveau 0 = milieu témoin avec ajout de 1,4 µL de méthanol uniquement).**

Combinaisons	Niveau affecté à :				Niveaux	Concentrations (mM) affectée à chaque niveau
	Quer.	Api.	Cat.	A.G.		
C0	0	0	0	0	0	0
C1	1	4	3	5	1	17,2
C2	5	6	7	1	2	5,7
C3	8	2	2	2	3	1,9
C4	4	7	1	9	4	0,6
C5	6	3	10	6	5	0,2
C6	7	10	4	7	6	$7,1 \cdot 10^{-5}$
C7	10	8	5	4	7	$2,4 \cdot 10^{-5}$
C8	9	5	8	10	8	$7,9 \cdot 10^{-6}$
C9	2	9	9	3	9	$2,6 \cdot 10^{-6}$
C10	3	1	6	8	10	$8,7 \cdot 10^{-7}$
C11	1	1	1	1	1	17,2

## Essais avec la culture mixte SPP

Les résultats de la première série d'essais réalisée avec SPP sont illustrés ci-après (Figure 45). Pour cette culture mixte, la combinaison C1 entraîne une augmentation de biomasse bactérienne significative par rapport au témoin C0 (culture en présence de HAP uniquement) et à C2.



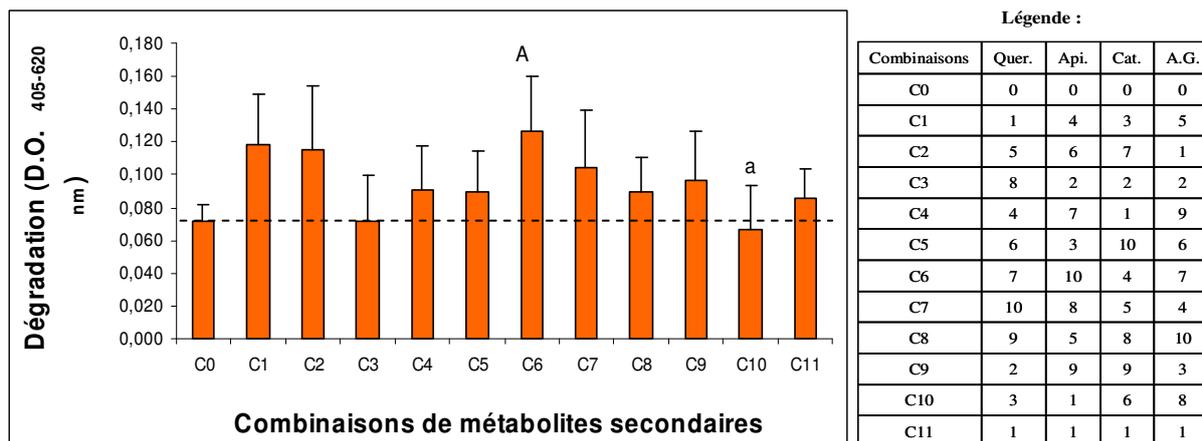
**Figure 45 : Effets comparatifs de la combinaison à différentes doses de quercétine, d'apigénine, de catéchine et d'acide gallique sur la croissance (45 jours) de la culture mixte SPP en présence de HAP en milieu minimum.** Légende : 10 niveaux de concentrations testés, du plus fort : niveau 1 (17,2 mM) aux plus faibles : niveau 10 ( $8,7 \cdot 10^{-7}$  mM) et niveau 0 (0 mM), regroupés en 10 combinaisons C1 à C10 plus un témoin « négatif » C0 (milieu + HAP uniquement) et un témoin « positif » C11 (présence des 4 métabolites à 17,2 mM). Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 8$ ). Différences significatives entre les groupes indiquées par « a » par rapport au groupe marqué par une lettre majuscule A.

Ces deux combinaisons, C1 et C2, sont respectivement caractérisées par la dose la plus élevée en quercétine et en acide gallique. L'influence négative de ce dernier sur la croissance de SPP avait déjà été soulignée durant les tests en plan complet en milieu minimum, en particulier en présence des HAP (Figure 43). **L'équation de la régression linéaire multiple tend à confirmer l'effet positif de la quercétine et celui inhibiteur de l'acide gallique :**

$$y = 0,0257 + (0,688 * \text{Quer}) - (0,0807 * \text{Api}) - (0,111 * \text{Cat}) - (0,451 * \text{A.Gal})$$

$$(R^2 = 0,247)$$

L'effet de la quercétine est en outre très significatif ( $p < 0,001$ ). L'estimation du catabolisme global par différence d'absorbance (D.O. 405-620 nm) est illustrée à la Figure 46.



**Figure 46 : Effets comparatifs de la combinaison à différentes doses de quercétine, d’apigénine, de catéchine et d’acide gallique sur l’activité globale de dégradation (45 jours) par la culture mixte SPP en présence de HAP en milieu minimum.** Légende : 10 niveaux de concentrations testés, du plus fort : niveau 1 (17,2 mM) aux plus faibles: niveau 10 ( $8,7 \cdot 10^{-7}$  mM) et niveau 0 (0 mM), regroupés en 10 combinaisons C1 à C10 plus un témoin « négatif » C0 (milieu + HAP uniquement) et un témoin « positif » C11 (présence des 4 métabolites à 17,2 mM). Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 8$ ). Différences significatives entre les groupes indiquées par « a » par rapport au groupe marqué par une la lettre majuscule A.

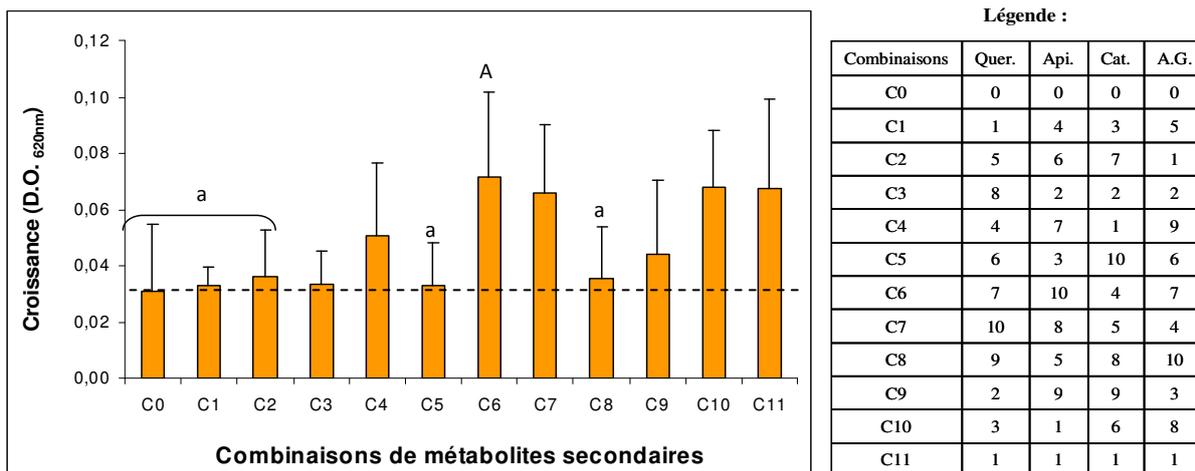
La combinaison C6 est mise en évidence par rapport à C10. La modalité C6 comprend la dose la plus faible d’apigénine, contrairement à C10, présentant justement la dose la plus forte pour la dite molécule. A titre indicatif (la normalité des distributions étant respectée mais pas l’homogénéité des variances) **l’équation de régression indiquerait également l’influence négativement prédominante de l’apigénine :**

$$y = 0,102 + (0,960 * Quer) - (2,458 * Api) - (0,896 * Cat) + (0,472 * A.Gal)$$

$$(R^2 = 0,194).$$

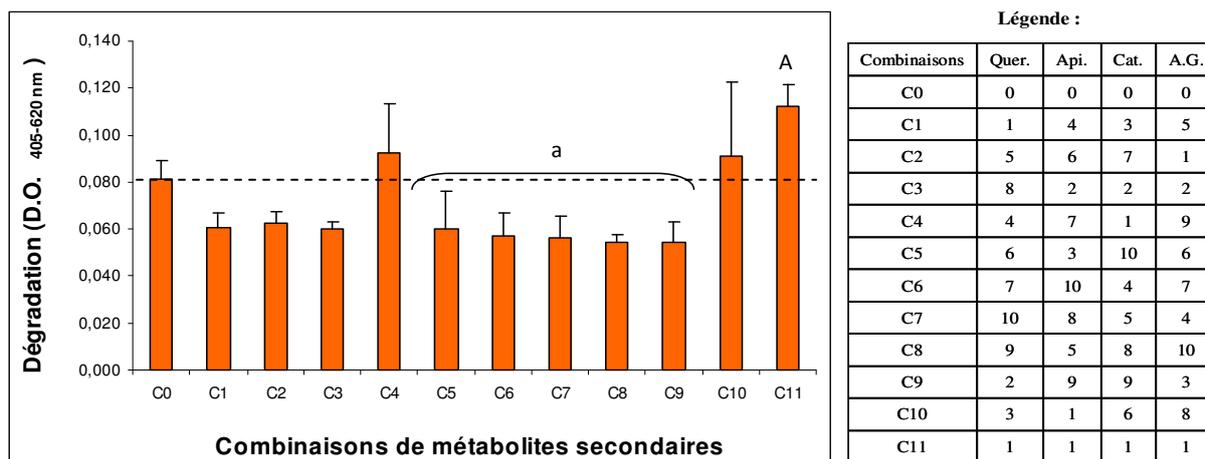
### **Essais avec la culture mixte LP**

Afin de vérifier si les mêmes combinaisons (essentiellement C1 et C6) et par conséquent l’influence positive de la quercétine et celle inhibitrice de l’apigénine, étaient mises en évidence avec les souches pré-sélectionnées (de divers milieux contaminés), les essais ont été également conduits avec la culture mixte LP (Figure 47 et 48). La distribution des données étant non paramétriques dans tous les cas, seules sont représentées des différences statistiques à l’issue des tests de comparaison de moyennes.



**Figure 47 : Effets comparatifs de la combinaison à différentes doses de quercétine, d’apigénine, de catéchine et d’acide gallique sur la croissance (45 jours) de la culture mixte LP en présence de HAP en milieu minimum.** Légende : 10 niveaux de concentrations testés, du plus fort : niveau 1 (17,2 mM) aux plus faibles: niveau 10 ( $8,7 \cdot 10^{-7}$  mM) et niveau 0 (0 mM), regroupés en 10 combinaisons C1 à C10 plus un témoin « négatif » C0 (milieu + HAP uniquement) et un témoin « positif » C11 (présence des 4 métabolites à 17,2 mM). Valeurs  $\pm$  écarts types (n = 8). Différences significatives entre les groupes indiquées par « a » par rapport au groupe marqué par une la lettre majuscule A.

Concernant la production de biomasse du *consortium* LP, seul l’ajout de métabolites d’après la combinaison C6 entraîne une croissance bactérienne significativement supérieure par rapport à celle obtenue avec les combinaisons C0, C1, C2, C5 et C8 (Figure 45, Tableau 23). Ce résultat rappelle celui énoncé précédemment avec le *consortium* SPP, la 2<sup>ème</sup> moyenne de croissance la plus élevée ainsi que l’activité de dégradation la plus forte ayant été mesurée pour cette combinaison C6 (Figure 46). ***Ce mélange est également caractérisé par la valeur la plus faible en apigénine, ce qui confirmerait le pouvoir bactériostatique de ce flavonoïde (Figure 41). La présence de la catéchine (niveau 4 : 0,6 mM, Tableau 23) confirmerait en revanche l’impact positif de cette molécule dans la croissance bactérienne.***



**Figure 48 :** Effets comparatifs de la combinaison à différentes doses de quercétine, d'apigénine, de catéchine et d'acide gallique sur l'activité globale de dégradation (45 jours) par la culture mixte LP en présence de HAP en milieu minimum. Légende : 10 niveaux de concentrations testés, du plus fort : niveau 1 (17,2 mM) aux plus faibles: niveau 10 ( $8,7 \cdot 10^{-7}$  mM) et niveau 0 (0 mM), regroupés en 10 combinaisons C1 à C10 plus un témoin « négatif » C0 (milieu + HAP uniquement) et un témoin « positif » C11 (présence des 4 métabolites à 17,2 mM). Valeurs  $\pm$  écarts types ( $n = 8$ ). Différences significatives entre les groupes indiquées par « a » par rapport au groupe marqué par une lettre majuscule A.

L'estimation de l'activité catabolique globale, illustrée à la Figure 48, indique clairement en revanche que la croissance obtenue avec la combinaison de métabolites C6 ne se répercuterait pas dans la dégradation globale des composés en présence. En effet, en présence de HAP, seul l'ajout des 4 polyphénols aux concentrations les plus élevées (C11 : 17,2 mM) entraîne une dégradation significative par rapport aux autres modalités C5, C6, C7, C8 et C9 (Figure 48). Une autre hypothèse serait qu'une assimilation rapide des intermédiaires de dégradation ait eu lieu dans certaines modalités, *i.e.* C6 et C7 (Figure 47).

*De manière générale, les tests incluant les effets combinés des quatre molécules de type flavonoïdes et dérivés tendent à confirmer la biostimulation des bactéries dégradantes par la quercétine et la catéchine, contrairement à l'apigénine et dans une moindre mesure l'acide gallique. Il apparaît donc à la suite de ces essais in vitro qu'une solution d'exsudats contenant majoritairement de la quercétine (potentiellement associée à de la catéchine) serait susceptible de promouvoir la biodégradation des HAP. La quercétine, et son dérivé glycosilé la rutine, constituent les métabolites secondaires majoritaires identifiés dans les exsudats racinaires de MxG (Tableau 19). Afin de vérifier l'apport de ces exsudats sur la biostimulation des communautés bactériennes et la dissipation in fine des HAP dans les sols, une phase d'essais en microcosmes a été menée par la suite.*

## III.2. ESSAIS EN MICROCOSMES

Cette approche permet l'étude des interactions exsudats-bactéries à un niveau de complexité supérieur. En effet, l'ensemble des conditions environnementales susceptibles d'affecter les interactions bactéries-plantes à l'interface sol-racines (texture et qualité des sols, contamination diverse ...) est alors pris en compte. Afin de mieux évaluer l'effet rhizosphérique résultant de l'adaptation de MxG aux substrats de culture, différents sols aux caractéristiques physico-chimiques contrastées ont été choisis : un sol standard A3 (artificiellement pollué et bioaugmenté en souches bactériennes dégradantes), trois sols de friche industrielle H1, H2 et M2 (aux degrés de contamination en HAP et métaux variés, Tableau 15), des cendres volantes non polluées (mais susceptible d'opposer de fortes contraintes au développement du végétal et des communautés microbiennes) et un sol de « référence » également non pollué (sol de norme ISO 11269-22,6 utilisé comme « témoin » pour la croissance de MxG, annexe 5).

### III.2.1. Détermination des caractéristiques physico-chimiques des sols

Le Tableau 24 résume les principaux paramètres physico-chimiques des différents sols utilisés pour les essais en microcosmes.

**Tableau 24** : Caractéristiques physico-chimiques des différents sols étudiés (sols de friche contaminés en HAP et en métaux : H1, H2 et M2; sol standard A3, sol « référence » et cendres volantes).

Types de sols		Granulométrie			pH (eau)	Conductivité ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	CEC <sup>a</sup> dont [K <sub>2</sub> O] (cmoles <sup>+</sup> /kg)	C.O.T. <sup>b</sup> (%)	C/N <sup>c</sup>
		S (%)	L (%)	A (%)					
Sols contaminés *	H1	79	15	6	7,8	144	8 [0,57]	8,54	15,7
	H2	79	15	6	8,06	189	8 [0,48]	8,56	15,6
	M2	66	20	14	8,04	407	8,1 [0,46]	11,53	20,9
Sols non contaminés	A3	46,5	35,5	18	7,7	<i>n.d.</i>	11,7	2,19	17,9
	« référence »	62	18,5	19,5	7,16	182	[K <sub>2</sub> O] : 0,43	2,58	<i>n.d.</i>
	Cendres	80	18,9	1,1	8,03	106	[0,08]	1,92	8,98

\* : sols de friche; S : sables; L : limons; A : argiles.

<sup>a</sup> : CEC : capacité d'échange cationique; <sup>b</sup> : C.O.T : carbone organique total; <sup>c</sup> : C/N : rapport carbone organique/azote organique; *n.d.* : non déterminé.

Les sols de friche H1 et H2 ont été prélevés dans la même zone d'échantillonnage et présentent des caractéristiques granulométriques identiques, avec une teneur prédominante en sables (S : 79%, L : 15%, A : 6%, Tableau 24). L'observation de particules collantes noires lors du tamisage du sol associée à l'activité ancienne de déchargement du coke dans la zone échantillonnée et des traces de phénols (BASOL, 2008) indiqueraient l'origine d'une contamination partielle du sol H1 par des goudrons de houille (mélange organique complexe inhérent aux processus de fabrication du coke) (Brown et al., 2006; Haeseler et al., 1999). Conformément à la classification de l'USDA (*United States Soil Department of Agriculture*) (Soil Survey Division Staff, 1993), les sols H1 et H2 peuvent être qualifiés de sablo-limoneux. La texture sableuse de ces sols favorise généralement la désorption et la minéralisation des HAP (Amellal et al., 2001; Karickhoff et al., 1979). Le sol M2, prélevé dans une autre zone de la friche, présente des proportions en limons et argiles plus marquées (S : 66%, L : 20%, A : 14%, Tableau 24). Il s'apparente ainsi à un sol limono-sableux. Concernant les sols non contaminés, le sol standard A3 s'apparente à un sol limono-sableux (S : 46,5%, L : 35,5%, A : 18%, Tableau 24) alors que le sol de « référence » modifié possède des caractéristiques texturales s'approchant de celles d'un sol sablo-limoneux (S : 62%, L : 18,5%, A : 19,5%, Tableau 24). Les cendres ont une texture sablo-limoneuse (S : 80%, L : 18,9%, A : 1,1%, Tableau 24).

Les valeurs de pH sont proches de 8 pour les trois sols de friche contaminés (Tableau 24), indiquant un caractère modérément alcalin, ce qui favorise l'activité de biodégradation et la croissance des populations microbiennes (Andreoni et al., 2004; Wilson & Jones, 1993). A ces pH, la totalité des nutriments devraient être disponibles d'un niveau modéré à élevé dans les trois sols (Soil Survey Division Staff, 1993). De plus, les métaux sont généralement précipités sous forme de carbonates, ce qui pourrait diminuer leur toxicité (Martínez & Motto, 2000). Les interactions hydrophobes liant les HAP à la matière organique du sol et, en particulier, aux acides humiques, sont aussi renforcées à ces valeurs de pH (Tableau 24) : du fait de la protonation des acides humiques, le maintien de la conformation tridimensionnelle réduit le passage en phase aqueuse et la biodisponibilité des HAP (Murphy et al., 1994). Les pH des sols non contaminés, légèrement alcalin (7,16 pour le sol de « référence ») à basique (8,03 pour les cendres, Tableau 24) sont également favorables à l'activité microbienne.

La CEC (Tableau 24 et annexe 5 F) est faible pour les trois sols de friche (~ 8 cmoles<sup>+</sup>/kg sol sec). Or, la conductivité de la solution du sol M2 (407  $\mu$ S/cm) est très élevée en comparaison à celles de H1 et H2 (144 et 189  $\mu$ S/cm respectivement, Tableau 24). Une plus

forte contamination en éléments traces métalliques pour M2 (Tableau 27) pourrait expliquer cette valeur élevée. Ces mesures de conductivités électriques sont toutefois en accord avec le maintien des processus biologiques (Kastner et al., 1998).

Dans les trois sols de friche, les teneurs en carbone organique total (C.O.T.) (Tableau 24) sont de l'ordre de 8,5 à 11,5% ce qui est supérieur aux valeurs usuelles (0,5 à 5%). Ces teneurs élevées confirmeraient la présence de matière minérale et/ou organique non extractible (matrice riche en carbone) dans le sol, comme c'est le cas dans les carbonates (Kerven et al., 2000), les goudrons de houilles (Brown et al., 2006; Haeseler et al., 1999), le noir de carbone et autres particules de charbon (Kerven et al., 2000; Knicker et al., 2007; Skjemstad & Taylor, 1999; Song et al., 2002). Ces valeurs ne représenteraient donc pas les niveaux endogènes de matière organique du sol, naturellement présents en l'absence de toute contamination.

Les ratios C/N très élevés des sols contaminés (respectivement 15,7; 15,6 et 20,9 pour H1, H2 et M2; Tableau 24), en comparaison à ceux généralement établis dans les sols non pollués, sont à mettre en relation directe avec les fortes teneurs en carbone. Pour les sols pollués en hydrocarbures, des ratios C/N très importants, de l'ordre de 9 :1 jusqu'à 200 :1, peuvent être nécessaires pour favoriser la croissance microbienne et la dégradation des hydrocarbures (Andreoni et al., 2004). On note également un rapport C/N élevé pour les cendres (8,98; Tableau 24) étant donné l'origine du matériau, indiquant la présence probable d'imbrulés. Les teneurs en cations extractibles de ce matériau sont illustrées de manière plus précise dans le Tableau 25 comparativement à celles du sol de « référence ».

**Tableau 25 : Teneurs en cations extractibles (oxydes) et en éléments traces métalliques des cendres et du sol A3 « référence ».**

Types de sols	Oxydes cationiques (mg/kg sol sec)			
	K <sub>2</sub> O	CaO	MgO	NaO
<i>Sol</i> « référence »	149 ± 0,4	4166 ± 276	288 ± 17	<i>n.d.</i>
<b>Cendres</b>	26 ± 10,5	726 ± 27	511 ± 111	19,8 ± 10,8

En dépit de l'absence de pollution pour les cendres, la qualité agronomique de ce substrat est susceptible de limiter la croissance de MxG. En effet, la composition en oxydes cationiques souligne une carence en potassium pour le matériau pulvérulent (de l'ordre de 26 mg/kg sol sec pour les cendres contre 149 mg/kg sol sec pour le sol A3 modifié en sol de

« référence », Tableau 25). Outre les caractéristiques physico-chimiques des sols, les teneurs en micropolluants présents sont également susceptibles d'être limitantes pour la croissance végétale.

### **III.2.2. Teneurs en métaux et composés cyanurés dans les sols**

Les sols de friches sont généralement caractérisés par des contaminations multiples, à la fois en substances organiques telles que les hydrocarbures (dont les HAP pour la fraction aromatique) et en substances inorganiques (essentiellement des éléments traces métalliques). D'autres types de molécules peuvent aussi être présentes à des valeurs supérieures à celles du fond géochimique en fonction de l'historique des activités du site (dérivés azotés, organochlorés, acides...).

Les teneurs en plomb et en chrome total, bien que plus élevées dans les cendres que dans le sol de « référence », demeurent inférieures à celles du fond géochimique (Tableau 27).

**Tableau 26 : Teneurs en métaux dans les sols non contaminés : sol de « référence » et cendres.**

Types de sols	Métaux (mg/kg sol sec)			
	Cu	Pb	Co	Cr
<i>Sol « référence »</i>	$12,4 \pm 0,4$	<i>n.d.</i>	$5,9 \pm 0,2$	$15,1 \pm 0,5$
<i>Cendres</i>	$52,8 \pm 2,7$	$5,8 \pm 13,2$	$16,5 \pm 0,2$	$56,6 \pm 0,2$
<i>Fond géochimique moyen (concentration maximale enregistrée)*</i>	30 (100)	30 (100)	15 (50)	75 (200)

\* données BRGM-INRA (2000)

Par ailleurs, les teneurs en HAP pour l'ensemble des sols non contaminés sont inférieures à la limite de détection. Les teneurs en métaux et en cyanures sont également répertoriées pour les trois sols de friche pollués étudiés H1, H2 et M2 (Tableau 27).

**Tableau 27 : Teneurs en métaux dans les sols de friche contaminés : H1, H2 et M2.** Les données relatives au fond géochimique et aux valeurs citées dans l'ESR de 2005 sont également reportées.

Métaux	Concentration dans les sols (mg/kg sol sec)			
	Fond géochimique	Zone échantillonnée : H1 – H2		Zone échantillonnée : M2
		ESR <sup>a</sup>	Valeurs mesurées H1 <sup>b</sup>	ESR <sup>a</sup>
Chrome total	75	58 - 67	15,6 (4,4)	48 - <b>140</b>
Cuivre	30	<b>53 - 140</b>	<b>112,4</b> (36,1)	<b>83 - 260</b>
Nickel	40	37 - 38	26,7 (3,3)	36 - <b>76</b>
Zinc	30	<b>740 - 830</b>	<b>138,4</b> (1,3)	<b>880 - 7700</b>
Plomb	120	<b>220 - 290</b>	<b>568,4</b> (1,3)	<b>530 - 10000</b>
<b>Cyanure total</b> (mg/kg sol sec)	-	-	<i>l.d.</i>	<b>11 - 163</b>

<sup>a</sup> : valeurs la plus basse et la plus haute répertoriées dans la zone d'échantillonnage d'après l'évaluation simplifiée des risques réalisée en 2005 (BASOL, 2008),

<sup>b</sup> : valeurs  $\pm$  erreur type, n = 3,

**en gras** : valeurs supérieures au fond géochimique,

*l.d.* : inférieur à la limite de détection.

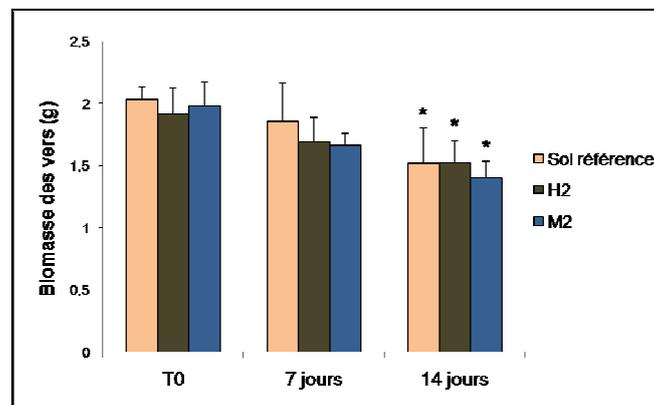
D'après l'ESR réalisée en 2005 pour la zone d'échantillonnage de M2, la contamination en métaux dans ce sol est globalement plus importante que dans le sol H1, supérieure d'un facteur 2,5 environ pour le chrome par exemple, *i.e.* 48 mg/kg sol sec contre 15 pour H1, à 20 pour le plomb, *i.e.* 10000 mg/kg sol sec contre 568 pour H1 (Tableau 27). La contamination en cyanures totaux est aussi notable pour ce sol M2 avec 163 mg de cyanures/kg de sol sec relevé comme valeur maximale; elle est inférieure à la limite de détection pour H1 et H2 (Tableau 27).

Les mesures physico-chimiques réalisées sur la fraction totale des sols associées aux contaminations d'origines multiples ne permettent pas d'illustrer la toxicité des sols résultant des interactions entre polluants organiques (HAP, cyanures) et métalliques au niveau biologique. Afin de mieux appréhender les dangers potentiels relatifs à l'usage de ces sols, soulignant par là-même la nécessité de mesures préventives voire curatives vis-à-vis de l'usage du site, la caractérisation écotoxicologique des sols H2 et M2 (utilisés ultérieurement pour les essais de culture *in situ*) a été réalisée suite à ces analyses.

### III.2.3. Caractérisation écotoxicologique des sols de friches H2 et M2

#### Test de toxicité aigüe portant sur la mortalité des vers de fumier *Eisenia fetida* (norme ISO 11268).

L'approche écotoxicologique, qui intègre l'impact de l'ensemble des polluants, constitue un complément nécessaire aux analyses physico-chimiques, en particulier dans le cadre d'une démarche de réhabilitation des sols (Le Corfec, 2011; Vasseur & Cossu-Leguille, 2003). Dans un premier temps, la caractérisation toxicologique initiale des sols de friche (à  $t_0$ ) a été évaluée vis-à-vis d'individus d'*Eisenia fetida*. Ce test permet d'intégrer l'ensemble des effets toxiques potentiels dans la mesure où l'activité fousseuse des vers et l'ingestion des particules de sols sont susceptibles de remobiliser une partie des contaminants. La mortalité ainsi que la biomasse globale de 50 individus d'*Eisenia fetida* ont été évaluées au bout de 7 et 14 jours d'exposition aux différents sols de friche contaminés H2, M2, et sol de « référence » (Figure 49). Un indice de condition générale à l'appréciation de l'observateur est aussi évalué au bout de 14 jours (van Herwijnen et al., 2007) classant les vers en catégorie « sensibles » (ou réactifs à des stimuli tactiles), moribonds (se déplaçant peu, ne répondant pas ou faiblement aux stimuli), ou morts (Tableau 28).



**Figure 49** : Caractérisation de l'écotoxicité des sols avant culture ( $t_0$ ) : évolution de la biomasse globale des vers de terre selon les types de sols (sol de référence, H2 et M2); différences significatives indiquées par : \* : par rapport à  $t_0$ .

Il n'y a aucune mortalité quel que soit le type de sol, et ce durant les 14 jours d'exposition, ce qui indique une absence de toxicité aigüe pour les sols H2 et M2. Afin de compléter cette information par des données plus sensibles, l'étude a été poursuivie au travers de l'évaluation de paramètres subléthaux : biomasse (Figure 49), aspect macroscopique et

comportement des lombriciens. Au bout de 14 jours d'exposition, la biomasse globale des vers a diminué de manière significative par rapport à  $t_0$  quel que soit le substrat, ce qui laisse supposer que pour la durée d'exposition considérée (14 jours) le manque de nourriture est le critère prépondérant dans la perte de poids. Cependant, l'analyse de l'état des individus révèle un pourcentage de vers moribonds significativement plus important pour les lots exposés au sol M2 que pour ceux du sol de « référence » (Tableau 28).

**Tableau 28 : Pourcentages d'individus « sensibles » et moribonds selon les types de sols : différence significative par rapport à H2 et sol standard indiquée par \* ( $p < 0,05$ ).**

Sol « référence »		Sol H2		Sol M2	
% indiv « sensibles »	% indiv « moribonds »	% indiv « sensibles »	% indiv « moribonds »	% indiv « sensibles »	% indiv « moribonds »
88 ± 13	12 ± 13	74 ± 13	26 ± 13	48 ± 13 *	50 ± 16 * (2% morts)

L'évolution de ces deux paramètres, biomasse et comportement, indiquent une toxicité respectivement plus marquée dans le sol M2, puis H2 vis-à-vis du sol de « référence ». Cette hypothèse est renforcée par l'observation morphologique des individus moribonds dont certains présentaient une légère dépigmentation et des strangulations ou nécroses localisées, déjà observées par Pearce et ses collaborateurs chez *Lumbricus rubellus* exposés à de l'arsenic et du cuivre (Pearce et al., 2002).

**Le sol M2, bien que témoignant d'une faible contamination en HAP (~25 mg/kg sol sec, Tableau 15) et un pH alcalin peu favorable à la dissolution des métaux (8,04; Tableau 24), exerce une toxicité sublétales plus marquée que pour H2 à moyen terme (14 jours). Des conditions physicochimiques plus favorables à la remobilisation des métaux dans le tractus digestif des lombriciens (destruction physique des agrégats, pH plus faible) mais aussi la présence d'autres contaminants dans ce sol (cyanures) pourraient en être la cause.**

La multiplicité des analyses (physico-chimiques et toxicologiques) permet ainsi d'accentuer les contrastes existant entre sols prélevés au sein d'une même friche industrielle, susceptibles d'impacter (plus ou moins favorablement) les processus de bioremédiation. Outre ces différents descripteurs, l'étude de l'évolution des communautés bactériennes (diversité et taille des populations) constitue un élément essentiel à la compréhension des processus de remédiation. En effet, la rhizodégradation des HAP découle directement des interactions

plantes-bactéries-polluants. Le suivi des communautés bactériennes sera réalisé à la fois par méthode culturale et par méthode moléculaire *i.e.* PCR-TTGE des ADNr 16S. La comparaison des profils des communautés bactériennes entre sols non plantés et plantés, en particulier à l'interface sol-racines (rhizoplane) vise à identifier les populations majoritaires sélectionnées au niveau de la rhizosphère de MxG, certaines pouvant faire partie des souches dégradantes initialement isolées à travers les cultures mixtes SP, SPP, SPS et SPG (Tableau 21 p160). Cet aspect de l'analyse de la diversité bactérienne par méthodes moléculaires nécessite au préalable le développement d'une méthode d'obtention d'acides nucléiques (comprenant des fragments d'ADN génomiques) à partir des différents sols étudiés.

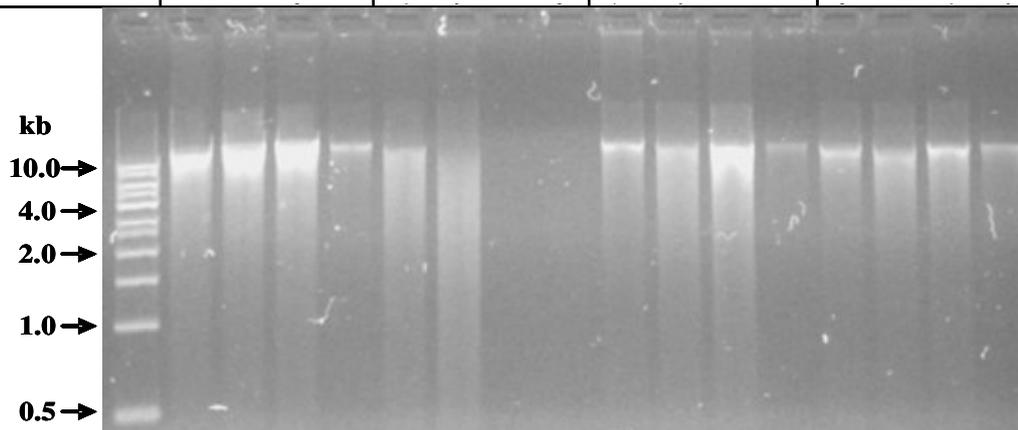
### **III.2.4. Développement d'une méthode d'extraction-purification d'acides nucléiques de sol : application à l'étude de la diversité des communautés bactériennes par méthode PCR-TTGE (ADNr 16S) (Técher et al., 2010)**

Afin d'établir une méthode rapide et adaptée à une large gamme de sols, les optimisations relatives à l'extraction et plus particulièrement à la purification d'acides nucléiques de sol ont été menées sur les trois sols utilisés en microcosmes : « H2 », « M2 », « S » (A3 modifié en sol de « référence », non pollué) et un sol « E » différant dans leurs caractéristiques physico-chimiques (Tableau 24, 15 et 27; « E » est aussi issu de la friche, avec des caractéristiques physico-chimiques similaires à « M2 » mais des teneurs en métaux plus élevées : Cr à 1800 mg/kg sol sec, Cu à 640 mg/kg sol sec, Ni à 590 mg/kg sol sec).

#### **Optimisation du pré-traitement des extraits brut d'acides nucléiques avant purification par les vitamines**

L'extraction d'acides nucléiques initialement réalisée avec le tampon de lyse TENNS (Tris-EDTA, NaCl, pyrophosphate de sodium, SDS) à pH 9,5 (sans addition de CTAB ni de KCl), en combinaison avec l'agitation physique ou "bead beating" (Miller et al., 1999), a permis l'extraction de molécules à haut poids moléculaire, supérieur à 10 kb (Figure 50, colonnes 1, 5, 9, 13).

Sols	« H2 »				« M2 »				“E”				“S”				
Conditions testées	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	
KCL	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	
CTAB	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
HA	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	
Marqueur moléculaire	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16



**Figure 50 : Acides nucléiques extraits des sols “H2”, “M2”, “E” et “S” en fonction de l’ajout de KCl/CTAB/AH. M : marqueur de poids moléculaire 1 kb; + HA : + 100 mg d’acides humiques/g de sol.**

L’utilisation conjointe du pyridoxal avec la thiamine pour la purification des acides nucléiques a permis l’élimination d’inhibiteurs de la PCR, confirmée par l’obtention de produits d’amplification dans chacune des conditions testées, à l’exception du sol « M » préalablement traité au KCl (Tableau 29). Par conséquent, le recours au pyridoxal a été maintenu dans l’élaboration du protocole à la place de la pyridoxamine utilisée par Dunbar et al. (2007). Dans le contexte de la purification d’acides nucléiques de sol, l’utilisation conjointe du pyridoxal et de la thiamine, pour établir des liaisons et neutraliser respectivement les groupements amine et carbonyle des acides humiques pourrait constituer une approche complémentaire (Booth et al., 1996; Khalifah et al., 1999), particulièrement pour des sols riches en matières organiques de compositions très variées comme ceux des sites de friches industrielles.

**Tableau 29 : Evaluation de la pureté des ADN extraits par amplification directe en PCR de la région v3 des ADNr 16S (Lakay et al., 2007). L'intensité de fluorescence des produits PCR sont quantifiés après migration en gel d'agarose (Quantity one Software v.4 Biorad). Les données obtenues (x) avec le logiciel sont exprimées en unité d'intensité de fluorescence relative (U) et reporté dans le tableau 30 comme suit : +++ :  $x > 3000$  U, ++ :  $2000 < x < 3000$  U, + :  $x < 2000$  U, - : aucune fluorescence observée.**

PCR V3		Echantillons de sols			
Conditions testées		H2	M2	E	S
A	- CTAB - KCL	+++	+	++	+
B	+ CTAB	+	++	++	+
C	+ KCl	+++	-	+++	++
D	+ HA + KCl	+	+	+	++

Néanmoins, la pureté de l'ADN de sol extrait n'est pas identique selon les types de sols, comme en témoigne l'intensité de fluorescence plus faible des bandes de produits PCR résultant des sols « M2 » et « S » (Tableau 29, condition A). L'analyse de l'inhibition d'amplification par PCR quantitative aurait constitué un marqueur plus sensible de la contamination résiduelle des ADN extraits des sols. Cependant, considérant d'une part la quantité importante d'acides humiques artificiellement rajoutés aux échantillons (100 mg d'acides humiques pur/g de sol, Tableau 29 condition D), et d'autre part la sensibilité de la PCR « classique » vis-à-vis de ces contaminants et autres substances inhibitrices présentes dans les sols pollués, le recours à une analyse binaire « réussite/échec » en PCR « classique » a constitué une approche à la fois simple et efficace pour évaluer la qualité des ADN extraits (Burgmann et al., 2001; Fortin et al., 2004; Lakay et al., 2007; Moreira, 1998).

Des étapes additionnelles de purification avant le recours aux vitamines (pyridoxal-HCl et thiamine-HCl) ont été nécessaires afin d'améliorer la pureté de ces ADN. Deux stratégies ont été testées : une précipitation partielle de contaminants *via* l'ajout de KCl et une flocculation avec le CTAB, détergent cationique (Thiele & Brümmer, 2002). Ces deux composés sont aussi connus comme précipitants du SDS (détergent du tampon de lyse), ce dernier pouvant interagir le cas échéant avec les vitamines (solubilisation et encapsulation micellaire) (Monferrer-Pons et al., 2003; Song et al., 2002). L'utilisation conjointe du CTAB et des vitamines a permis l'amplification de la région V3 des ADNr 16S à partir de chaque type de sol. Toutefois, l'intensité de fluorescence des bandes de produits PCR sur gel d'agarose était similaire à celle de la condition initiale A (sans ajout de CTAB) voire plus faible pour le sol « H2 » (Tableau 29, condition A comparée à condition B). L'addition de

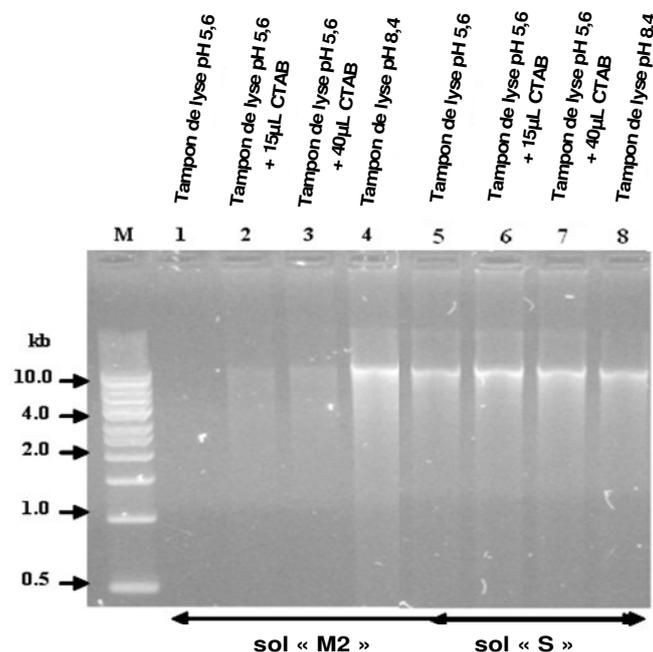
KCl avant le recours à la purification grâce aux vitamines a amélioré l'élimination d'inhibiteurs de PCR pour les sols « E » et « S » (Tableau 29, condition A vs condition C). En revanche, aucune trace d'ADN n'a pu être décelée sur gel d'agarose après extraction avec KCl à partir du sol « M2 » (Figure 50, colonne 7). Cette observation a pu être confirmée par l'absence d'amplification (Tableau 29). Dans le cas présent, il semblerait que l'addition de KCl ait entraîné d'importantes pertes d'ADN, probablement précipité ou adsorbé aux particules de sol. Toutefois, étant donné que le traitement avec KCl avait nettement amélioré la clarté des extraits bruts d'acides nucléiques de sol après la phase initiale d'extraction (lyse chimique et agitation), se répercutant sur la pureté des extraits des sols « H2 », « E » et « S », l'application de ce pré-traitement a été testée de manière plus approfondie en tant que méthode de purification alternative pour des sols à teneur particulièrement élevée en acides humiques. L'obtention d'acides nucléiques suffisamment purs pour être directement amplifiés par PCR a été évaluée à partir des mêmes types de sol « H2 », « E », « S » et « M2 », mais supplémentés en acides humiques (+ 100 mg HA/g sol) avant l'ajout initial du tampon de lyse. En dépit de cette quantité importante de substances humiques (une situation rarement rencontrée en sol de friche), et du fait que ces molécules soient capables de se lier de manière covalente avec les acides nucléiques (Tsai & Olson, 1992; Young et al., 1993), de l'ADN a pu être extrait et suffisamment purifié pour permettre une amplification directe par PCR à partir d'échantillons issus des sols « H2 », « E », « S » (Tableau 29). Dans le cas du sol « M2 » supplémenté en acides humiques, l'intensité de fluorescence de la bande correspondant à de l'ADN génomique n'était pas suffisante pour être numérisée après migration sur gel d'agarose (Figure 50, colonne 8). Cependant, la présence d'ADN a pu être détectée suite à l'amplification par PCR (Tableau 29). Il se peut que certaines substances (non déterminées) ou la nature de la matière organique dans ce type de sol conduisent à une adsorption des acides nucléiques, un phénomène qui serait largement favorisé en milieu salin très concentré (KCl 4M). L'ajout d'acides humiques aux propriétés physico-chimiques similaires à celles de l'ADN, pourrait alors entrer en compétition avec les acides nucléiques au niveau des sites d'adsorption et limiter la précipitation de ces derniers.

Finalement, l'utilisation de CTAB à la place du KCl a permis une meilleure extraction de l'ADN, en comparaison à celles réalisées sans CTAB (Figure 50, colonnes 2 vs 1, 6 vs 5, 10 vs 9, 14 vs 13). Toutefois, la contamination des extraits d'ADN était plus élevée, particulièrement pour le sol « S », indiqué par une fluorescence des produits PCR moins importante en comparaison de celle obtenue pour les échantillons pré-traités avec KCl (Tableau 29). Par conséquent, des extraits d'acides nucléiques suffisamment purs à partir

d'échantillon de sols supplémentés par 100 mg d'acides humiques/g de sol n'ont pu être obtenus par cette méthode.

### Effets du pH du tampon de lyse pour l'amélioration de l'extraction et de la purification d'acides nucléiques

Afin d'établir un protocole d'extraction d'acides nucléiques qui soit applicable aux différents sols étudiés, l'effet du pH du tampon de lyse a été optimisé. Pour cela, des séries d'extractions ont été réalisées avec un tampon de lyse à pH alcalin (8,4) à acide (5,6) sur les sols « S » et « M2 » pour lequel l'utilisation de KCl n'était pas adaptée (Figure 51).



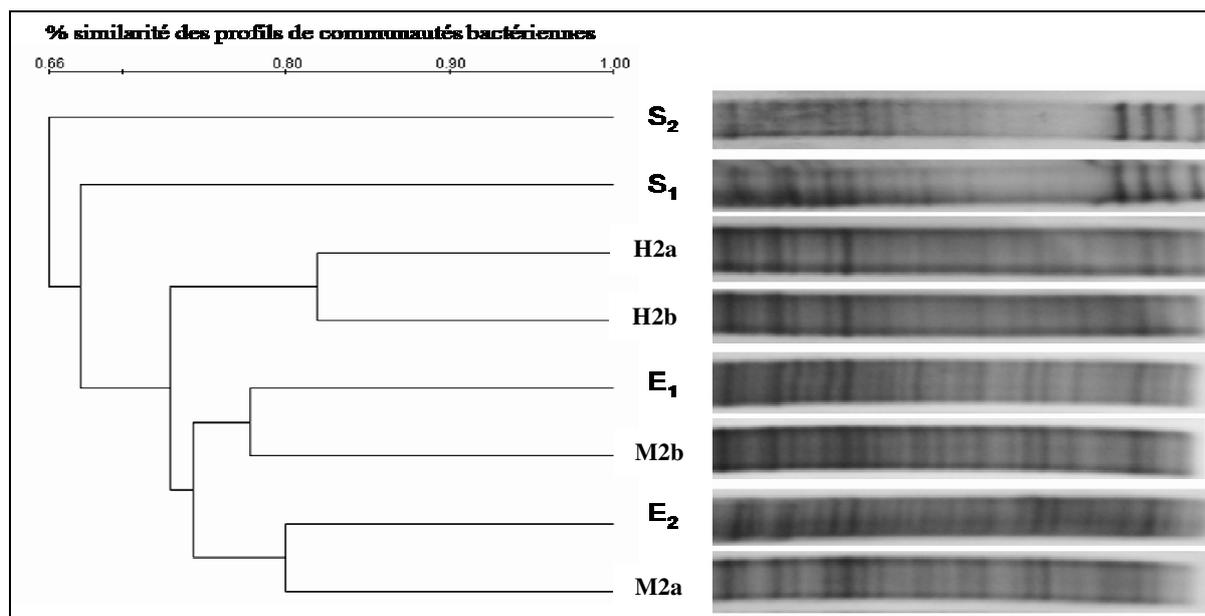
**Figure 51 : Extractibilité des ADN totaux (poids moléculaires) à partir des sols “M2” et “S” en fonction du pH du tampon de lyse et du volume de CTAB ajouté. M : marqueur de poids moléculaire 1 kb.**

Les différentes combinaisons testées sur le sol « M2 » ont confirmé l'effet positif du CTAB limitant les pertes d'acides nucléiques (Figure 51, colonnes 2 et 3 vs 1). Cependant, le pH du tampon de lyse semblait être le principal paramètre influençant l'extraction et la purification des extraits obtenus. Un tampon de lyse à pH alcalin de 8,4 a permis de récupérer davantage d'ADN qu'un tampon de lyse à pH de 5,6 pour le sol « M2 » (Figure 51, colonne 4 vs 1). Aucune différence n'était notable concernant le sol « S ». Un essai comparatif entre les sols « M2 » et « S » a finalement été conduit afin de mettre en évidence la valeur de pH la plus appropriée pour l'obtention d'ADN pouvant être amplifié par PCR à partir des deux types de sols. Ainsi, l'intensité de fluorescence la plus forte liée à la présence d'acides

nucléiques (incluant de l'ADN génomique) extraits à partir du sol « M2 » d'une part, et à la présence de produits d'amplification d'ADN par PCR pour le sol « S » d'autre part a pu être obtenue pour une valeur de pH de 7,5 (observations personnelles). Les extractions d'acides nucléiques furent finalement reconduites à cette valeur de pH sur les sols « H2 » et « E » (avec utilisation de CTAB) avant analyse des profils de diversité bactérienne par méthode PCR-TTGE.

### Vérification de la reproductibilité de la méthode : analyse des profils bactériens obtenus par PCR-TTGE

La reproductibilité de l'ensemble de la méthode d'obtention d'ADN de sol, allant de l'étape initiale d'extraction à celle finale d'amplification par PCR, a été vérifiée par comparaison des profils de diversité bactérienne. Ces derniers ont été obtenus après migration en TTGE des fragments d'ADNr 16S extraits de répliquats des différents sols "H2", "M2", "E" et "S" (Figure 52).



**Figure 52** : Analyse par méthode UPGMA (« Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean ») des profils TTGE obtenus après migration des fragments d'ADNr 16S extraits de répliquats de sols "H2", "M2", "E" et "S", d'après la méthode CTAB-vitamines (tampon de lyse à pH 7,5).

Les profils de diversité bactérienne générés après migration des différents mélanges de fragments d'ADNr 16S correspondant à chaque type de sol, en utilisant la méthode optimisée de purification par CTAB-vitamines (tampon de lyse à pH 7,5), ont été comparés sur la base de présence/absence de bandes par méthode UPGMA (Figure 52). Les répliquats d'extraction-

purification pour chaque sol (“H2”, “M2”, “E” et “S”) sont similaires les uns aux autres en terme de diversité bactérienne (Figure 52), indiquant que la méthode est reproductible. Le profil de diversité du sol “S”, sol non contaminé artificiellement reconstitué, se démarque des autres sols de friche pollués (Figure 52). Les profils de ces derniers présentent de fortes similitudes (de l’ordre de 80%, Figure 52). On peut remarquer toutefois que les échantillons issus du sol “M2” ont une plus grande similarité avec ceux du sol “E” qu’avec ceux du sol “H2”, probablement dû à sa contamination plus importante en éléments traces métalliques.

**En définitive, la technique de purification par utilisation de CTAB-vitamines est potentiellement applicable à une grande variété de sols, après ajustement du pH du tampon de lyse. Un pH de 7,5 s’est révélé approprié à l’extraction-purification d’acides nucléiques à partir des sols de friche étudiés. Par ailleurs, le développement de la méthode a également donné lieu à une technique de purification alternative, comprenant un « salting-out » au KCl à la place du CTAB, particulièrement adaptée pour des sols à forte teneur en acides humiques (de l’ordre de 100 mg/g de sol). La technique optimisée d’extraction-purification d’acides nucléiques au CTAB-vitamines a été utilisée pour le suivi de l’évolution des communautés bactériennes dans les différents sols soumis aux essais de phytoremédiation (en microcosmes). La comparaison des profils de diversité bactérienne obtenus entre sols plantés et non plantés pourra ainsi mettre en évidence l’émergence de populations majoritaires liées à la présence des racines de MxG et potentiellement à la dégradation des HAP.**

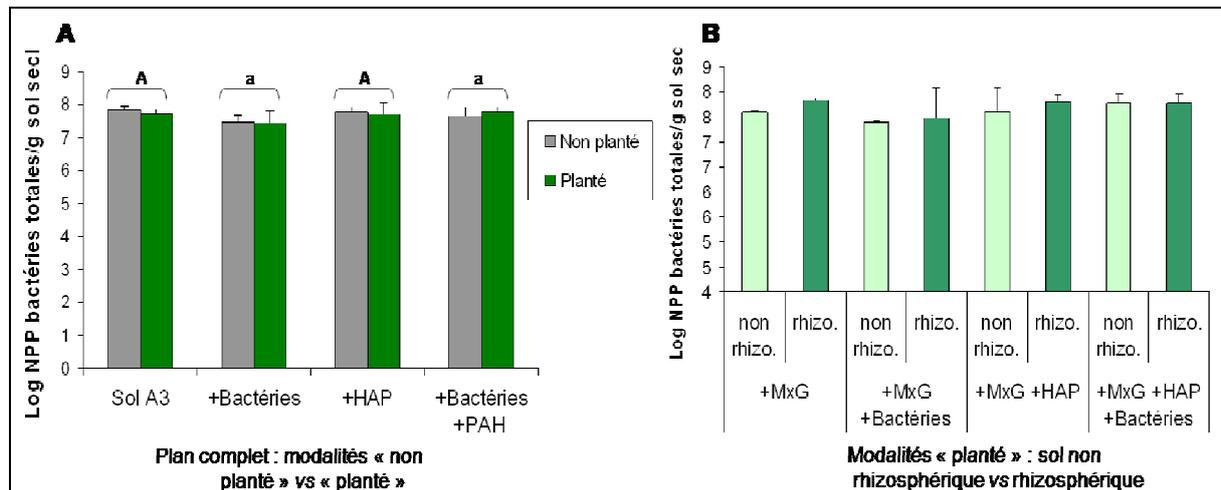
### **III.2.5. Essais en microcosmes « reconstitués » avec sol standard**

#### **A3 (Técher et al., 2012a)**

Dans un premier temps, faisant suite à la caractérisation initiale des sols et à l’optimisation des techniques requises pour le suivi des communautés bactériennes, des cultures de MxG (incluant des modalités « non planté ») ont été réalisées dans un sol standard A3. Afin de mieux appréhender le devenir des HAP en présence de bactéries dégradantes et l’impact de la culture de MxG sur ces deux composantes, un sol de friche « fraîchement » contaminé a d’abord été reconstitué en laboratoire (conditions semi-contrôlées). La comparaison des communautés bactériennes (dénombrement et analyse de la diversité des populations majoritaires) ainsi que la dissipation des HAP ont été évaluées après 3 mois de culture.

### III.2.5.1. Dénombrement de la microflore totale

Après culture, les dénombrements bactériens ont été réalisés en différenciant dans les microcosmes plantés, le sol rhizosphérique (prélèvements réalisés à une distance inférieure ou égale à 6 mm des racines) du sol non impacté de manière directe par les racines (pas de racine visible dans la zone de prélèvement) (Figure 53) (Corgie et al., 2004).



**Figure 53 : Dénombrement de la microflore totale en sol A3** : non ensemencé non contaminé, + Bact. : ensemencé en bactéries dégradantes, + HAP : contaminé en phénanthrène et pyrène chacun à 100 mg/kg sol sec, Log NPP/g sol sec, moyennes  $\pm$  écarts types ( $n = 4$ ). Différences significatives résultant d'ANOVA à 3 facteurs indiquées par des lettres majuscules vs minuscules (modalités du facteur significatif).

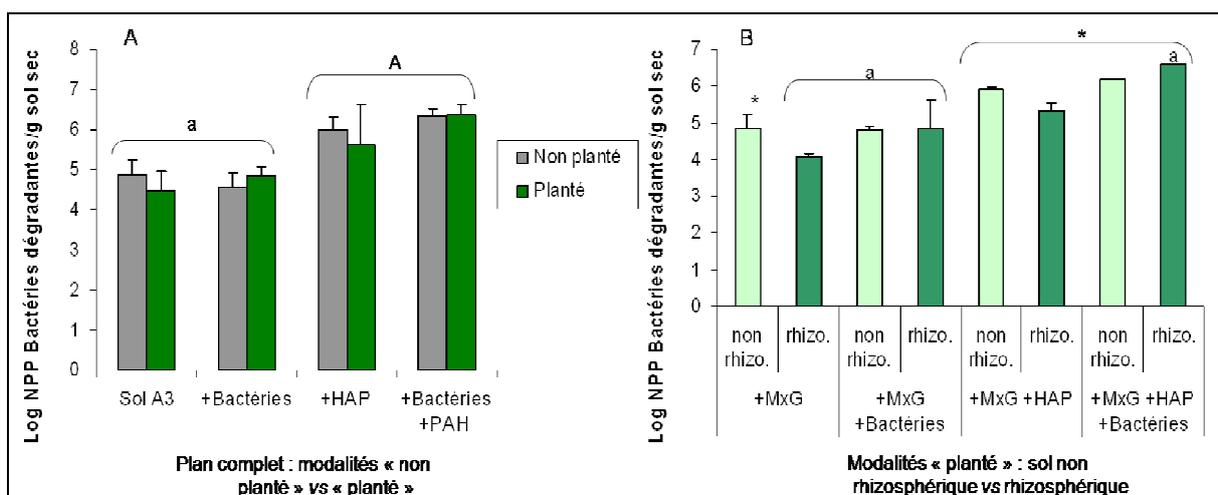
Le nombre de bactéries totales cultivables est de l'ordre de  $10^{7.5}$  à  $10^8$  cellules / g de sol sec (Figure 53), indiquant des conditions favorables à l'activité biologique et à la prolifération des populations bactériennes dans toutes les modalités (Nichols et al., 1997). Ce dénombrement, réalisé après 3 mois de culture, ne révèle pas de différences significatives entre les modalités « non planté » et « planté » (Figure 53). Ces résultats suggèreraient d'allonger la durée de culture lors d'essais ultérieurs. En revanche, l'inoculation en bactéries dégradantes (issues des cultures mixtes sélectionnées par pression pyrène et divers co-métabolites -§ III.3.1 et inoculées après ajustement de D.O.  $_{620nm}$  dans de l'eau physiologique pour une densité finale de  $10^6$  bact./g sol sec, III.3.2.4) réduit la taille de la microflore totale (Figure 53, A et a :  $p < 0,05$ ) : la bioaugmentation pourrait avoir entraîné une compétition entre les souches ensemencées autochtones sur l'échelle de temps considérée (Kastner et al., 1998; Shen & Bartha, 1996); d'autre part, l'apport en sels (NaCl) contenu dans la suspension des *inocula* bactériens (réalisés dans de l'eau physiologique, II.3.2.4) a pu avoir pour conséquence une modification des conditions physico-chimiques du sol pouvant ralentir la

croissance bactérienne (augmentation de la salinité, variation de pH, d'après Kastner et al. (1998).

La distinction entre sols « rhizosphériques » et « non rhizosphériques » n'a pas permis de révéler de différence significative dans le dénombrement des bactéries totales (Figure 53 B). Ces résultats traduisent le fait que le volume racinaire était important dans les pots, rendant les ramifications racinaires souvent non distinguables de la matrice organominérale du sol. Le « turn-over » (Miya et al., 2001) racinaire a également pu impacter significativement le sol des pots plantés en masquant l'effet rhizosphérique uniquement lié à l'exsudation racinaire.

### III.2.5.2. Dénombrement de la microflore dégradante

Parallèlement à la microflore totale, les bactéries dégradantes ont aussi été dénombrées par méthode du NPP adaptée en microplaques; après culture en milieu minimum de Buschnell-Hass enrichi en HAP. Les résultats sont illustrés à la figure 54.



**Figure 54 : Dénombrement de la microflore dégradante en sol A3 : non ensemencé non contaminé, + Bact. : ensemencé en bactéries dégradantes, + HAP : contaminé en phénanthrène et pyrène chacun à 100 mg/kg sol sec, Log NPP/g sol sec, moyennes  $\pm$  écarts types ( $n = 4$ ). A : différences significatives résultant de l'analyse factorielle (ANOVA 3 facteurs) indiquées par des lettres majuscules vs minuscules (modalités du facteur significatif); B : différences significatives indiquées par des lettres minuscules ou \* entre les groupes indiqués.**

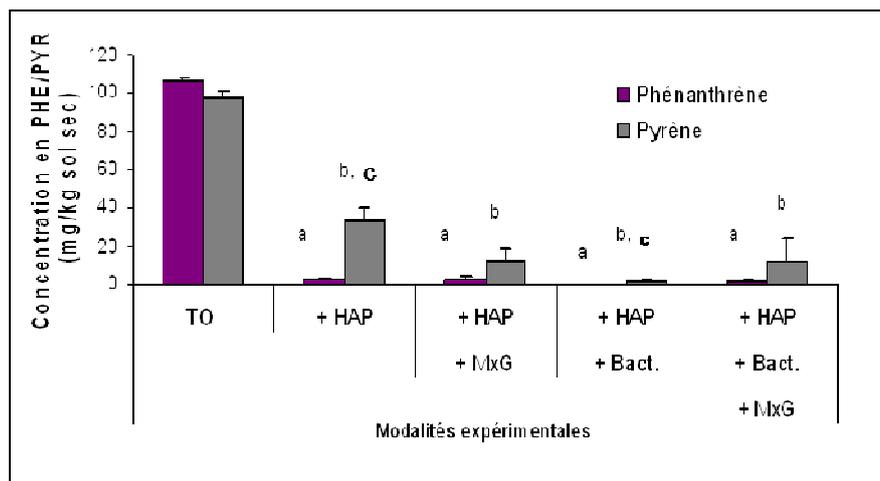
On note tout d'abord la présence d'une microflore dégradante dans toutes les modalités de culture, y compris celles caractérisant les sols sans bioaugmentation (Figure 54, modalités [A3 et +HAP]). La capacité de dégradation du phénanthrène, répandue chez les bactéries du sol des régions habitées (Günther et al., 1996; Johnsen & Karlson, 2005), pourrait

expliquer la présence et la prolifération de souches dégradantes au sein des modalités non enrichies en bactéries dégradantes.

Aucune différence significative n'est relevée de manière globale entre les modalités « planté » et « non planté » (Figure 54 a). Le principal facteur influençant de manière significative la taille des populations dégradantes est la contamination en HAP (Figure 54 a, A et a :  $p < 0,05$ ). En d'autres termes, la présence de HAP assimilables par les bactéries apparaît comme la condition *sine qua non* pour une augmentation significative des populations bactériennes dégradantes dans les sols, confirmant les travaux de Allard et collaborateurs (2000). Il faut cependant souligner que la présence de composés organiques plus facilement assimilables dans les exsudats racinaires de MxG, *i.e.* sucres, acides aminés, acides organiques (Hromadko et al., 2010; Técher et al., 2011), n'a pas inhibé les capacités de dégradation des HAP contrairement aux observations récentes de Mueller et Shann (2006). Par ailleurs, les microcosmes ont étéensemencés avec des souches bactériennes isolées après pression de sélection avec du pyrène (inoculation en bactéries dégradantes issues des *cultures mixtes* sélectionnés par pression pyrène et divers co-métabolites -§ III.3.1 et III.3.2.4), ce qui pourrait masquer l'effet rhizosphérique (et notamment la stimulation de la dégradation par co-métabolisme exsudats-HAP) (d'après Gunther et al., 1996) étant donné l'adaptation *a priori* des bactéries à cette source de carbone spécifique.

### ***III.2.5.3. Dissipation des HAP dans les modalités de sol A3 contaminé***

Afin de relier l'augmentation des populations bactériennes dégradantes à la dégradation des HAP, la fraction des polluants extractibles à l'hexane a été déterminée avant et après expérimentation dans les microcosmes initialement contaminés par du phénanthrène et du pyrène (à 100 mg/kg sol sec chacun; Figure 55).



**Figure 55 : Détermination de la fraction de HAP extractible à l'hexane après culture (mg/kg sol sec) :** + HAP : contaminé en phénanthrène et pyrène chacun à 100 mg/kg sol sec, + Bact. : ensemencement en bactéries dégradantes à t<sub>0</sub>, + MxG : microcosme planté en *Miscanthus x giganteus*; valeurs ± écarts types (n = 4). Différences significatives indiquées par : a : par rapport à t<sub>0</sub> pour le phénanthrène, b : par rapport à t<sub>0</sub> pour le pyrène et c : par rapport au pyrène de la modalité [+ HAP].

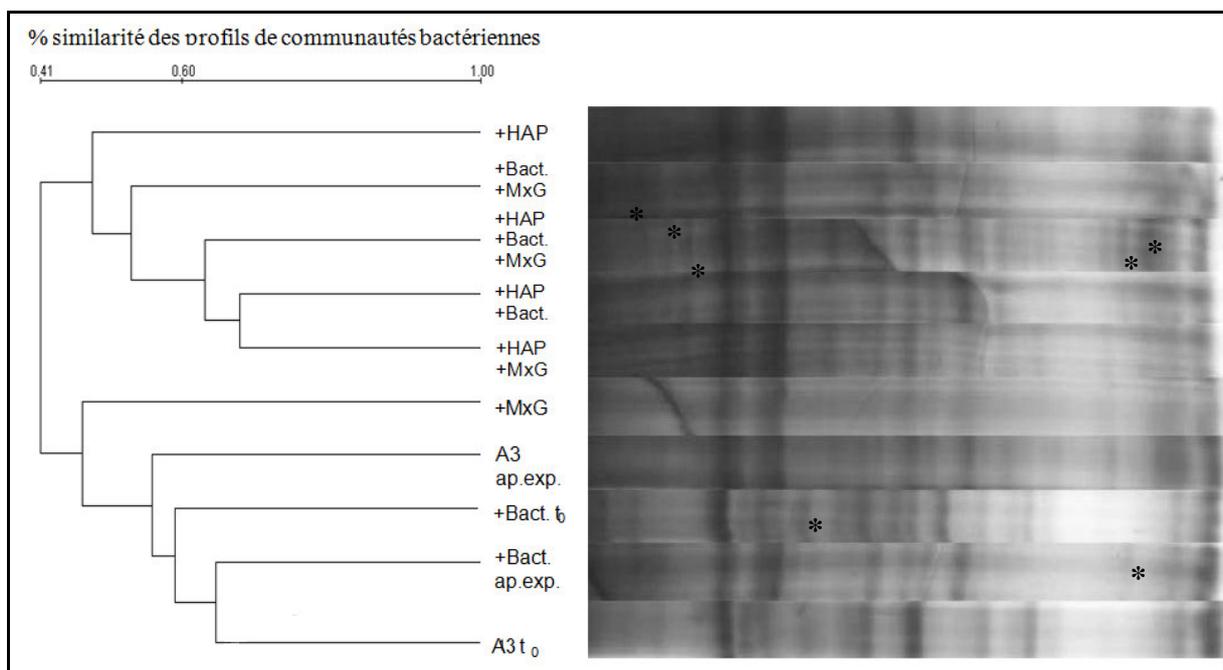
Les concentrations en phénanthrène et en pyrène mesurées au temps initial (t<sub>0</sub>) sont similaires pour l'ensemble des microcosmes, avec une concentration moyenne de 100 mg/kg de sol sec (Figure 55), confirmant l'efficacité de la méthode de contamination employée (Brinch et al., 2002) et la répétabilité des extractions au soxhlet (Berset et al., 1999). De manière générale, des diminutions significatives des teneurs en phénanthrène et pyrène sont notées dans tous les microcosmes contaminés, montrant la dissipation naturelle de ces composés dans nos modalités expérimentales (Figure 55, a et b : p < 0,05). Celle-ci est par ailleurs clairement dépendante du nombre de cycles des molécules avec la dissipation quasi complète du phénanthrène, molécule à 3 cycles, et partielle pour le pyrène (Figure 55). Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature, qui indiquent que les HAP à hauts poids moléculaires (4 cycles et plus) sont plus récalcitrants à la dissipation que ceux à faibles poids moléculaires (moins de 4 cycles) (Cheema et al., 2009; Lee et al., 2008; Sun et al., ; Wei & Pan).

La diminution des teneurs en pyrène est généralement plus marquée dans les microcosmes initialement ensemencés en bactéries dégradantes (Figure 55, modalités [+ HAP + Bact.] et [+ HAP + Bact. + MxG]). Ce résultat conforte l'hypothèse énoncée concernant l'utilisation des HAP comme source de carbone spécifique par les bactéries dégradantes inoculées. De plus, la présence parmi ces dernières, de souches affiliées aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus* ou *Acinetobacter* (Tableau 20 p158), pourrait aussi avoir contribué à la solubilisation des HAP initialement ajoutés sous forme de cristaux, facilitant ensuite leur

dégradation par l'ensemble des bactéries présentes (Menezes Bento et al., 2005; Mulligan, 2005).

#### **III.2.5.4. Analyse des profils de diversité des communautés bactériennes (méthode PCR-TTGE des ADNr 16S)**

La présence de MxG n'a pas entraîné de modification de la taille des populations bactériennes cultivables ni de diminution significative des teneurs en HAP par rapport aux modalités non plantées. Toutefois l'analyse de la dissipation du pyrène suggérait un apport notable des exsudats dans la dégradation de ce HAP « lourd ». La comparaison des profils bactériens de l'ensemble des modalités expérimentales a été réalisée afin de confirmer l'impact des différents facteurs qui ont pu être jusqu'à lors soulignés (présence de HAP, inoculation en bactéries dégradantes) sur la structuration des communautés (Figure 56).



**Figure 56 : Profil de diversité bactérienne (ADNr 16S) des différentes modalités en microcosmes à  $t_0$  (après ensemencement en bactéries et ajout de HAP) et après la période de culture de MxG (ap.exp.); phylotypes différents indiqués par « \* »; comparaison par méthode UPGMA, « Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean »; (A3  $t_0$  : sol A3 avant culture, modalités 000, 001, 010 confondues, Tableau 13 p138); (+ HAP, + Bact.+ MxG, + HAP + Bact.+ MxG, + HAP + Bact., + HAP + MxG, + MxG : modalités respectives 100, 011, 111, 110, 101, 001 du tableau 13 p138 après expérimentation).**

L'analyse des profils de diversité bactérienne avant et après expérimentation permet de distinguer globalement deux groupes (Figure 56). D'une part, six profils recoupant les modalités initiales à  $t_0$  et celles sans HAP après expérimentation (moitié inférieure de la figure, [+MxG] à [A3  $t_0$ ]), et d'autre part les profils caractérisés par la présence des HAP

analysés après culture (moitié supérieure de la figure, [+HAP] à [+HAP +MxG]). L'influence principale des HAP sur l'évolution des populations bactériennes dominantes, énoncée durant les dénombrements de bactéries dégradantes, est donc vérifiée à travers l'analyse de similarité des profils. Ces résultats confirmeraient ainsi l'utilisation de cette source de carbone spécifique par la microflore dégradante.

La similarité plus marquée entre [+Bact. ap.exp.] et le sol A3 à  $t_0$  indique une « disparition » de certaines souchesensemencées, au profit des bactéries indigènes plus adaptées aux conditions oligotrophes du sol en absence de HAP, confirmant l'hypothèse de compétition entre bactéries autochtones et allochtones. La similarité entre [A3 ap.exp.] (sol A3 nonensemencé à  $t_0$ ) et [+Bact.  $t_0$ ] est en accord avec la mise en évidence d'une microflore dégradante dans ce sol (de l'ordre de  $10^5$  bactéries/g sol sec; Figure 54) de même que dans le sol de la modalité [+MxG] (bien qu'il n'y ait pas de HAP dans ces cas précis). Il est intéressant de souligner à ce sujet que la modalité [+MxG] offre 47% de similarité avec les modalités contaminées (+HAP) que celles qui ne le sont pas (Figure 56). L'influence de la plante, *i.e.* l'« effet rhizosphérique », apparaît de manière plus sensible dans la structure des communautés avec la présence de MxG dans chacun des niveaux supérieurs du cladogramme (Figure 56).

*En résumé, ces essais en microcosmes ont montré qu'en situation de sol artificiellement contaminé, la biodégradation des HAP est favorisée par la présence de bactéries dégradantes et de MXG. Pour les HAP lourds tels que le pyrène, elle est accentuée par la bioaugmentation en bactéries dégradantes. Dans une moindre mesure, la biostimulation de la dégradation de ce HAP pourrait aussi être liée à la présence de MxG, ce qui irait dans le sens des résultats obtenus en microplaques avec exsudats totaux (III.1.3.1). Ces exsudats permettraient également le maintien de populations bactériennes dégradantes au niveau rhizosphérique.*

### **III.2.6. Essais en sols de friche**

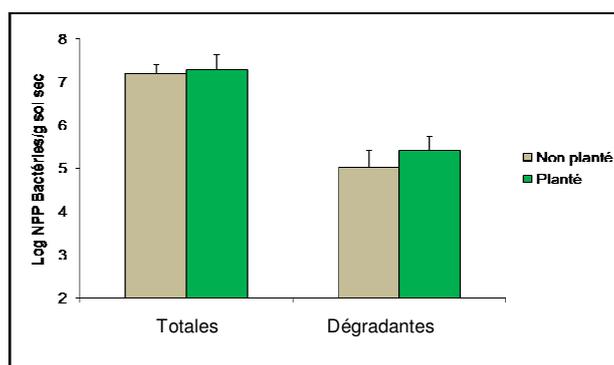
#### **III.2.6.1. Essais en sol contaminé H1**

Afin de vérifier l'apport des exsudats de MxG dans la dissipation des HAP lourds, des cultures en sol de friche (contamination ancienne avec HAP peu biodisponibles en l'état) ont été réalisées (PE2, planté contre non planté). Les descripteurs précédemment utilisés pour le

suivi du processus de rhizoremédiation ont été à nouveau retenus : taille et diversité des communautés bactériennes, évolution des teneurs en HAP.

### **III.2.6.1.1. Dénombrements et diversité des communautés bactériennes**

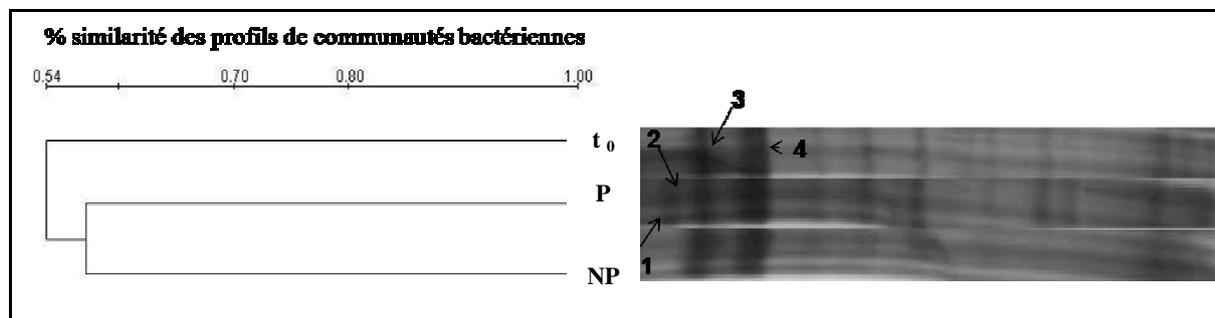
La texture très sableuse des sols de friche H1 et H2 ainsi que le réseau racinaire particulièrement dense et pénétrant de MxG, observé par Neukirchen et collègues (1999) et confirmé au cours de la présente étude (III.1.3.2.4), ont conduit à considérer la totalité des sols des pots plantés comme « rhizosphériques ».



**Figure 57 : Dénombrement des bactéries cultivables totales et dégradantes en sol de friche H1 après culture.**

La figure 57 illustre le nombre de bactéries cultivables totales et le nombre de bactéries dégradantes du sol de friche H1 ( $\Sigma 16$  HAP = 1500 mg/kg sol sec), déterminés par la méthode du NPP adaptée en microplaques (Stieber et al., 1994; Wrenn & Venosa, 1996). Ces dénombrements sont respectivement de l'ordre de  $10^7$  et  $10^5$  cellules/g de sol sec quelles que soient les modalités considérées (Figure 57). Ils sont similaires à ceux reportés dans la littérature pour des sols contaminés (Nichols et al., 1997) mais n'indiquent pas de différence significative entre les pots plantés et non plantés (Figure 57). Plusieurs études de phytoremédiation ont mis en évidence l'enrichissement à la fois spécifique et significatif des populations dégradantes dans le compartiment rhizosphérique des sols contaminés (Günther et al., 1996; Krutz et al., 2005; Miya et al., 2000). Cependant, des résultats semblables à ceux observés ici, ont été reportés par Nichols et ses collaborateurs (1997) avec la rhizoremédiation par une autre graminée, le « bluegrass ». En effet, la déstructuration des agrégats de sol durant le prélèvement sur site et le tamisage, l'apport en dioxygène (aération du sol) et en eau lors de la préparation des microcosmes sont autant de paramètres susceptibles de favoriser la biodisponibilité des HAP et la croissance microbienne. Ce phénomène, plus connu sous le terme de « priming effects », peut masquer les effets du traitement de phytoremédiation (Joner et al., 2004).

Afin d'appréhender l'impact racinaire de MxG sur les communautés bactériennes en s'affranchissant des contraintes liées à la culture des microorganismes, l'analyse des profils de diversité bactérienne a également été réalisée par PCR-TTGE (Figure 58).



**Figure 58 : Comparaison des profils de diversité bactérienne du sol H1 au temps initial (t<sub>0</sub>), et après expérimentation dans les pots plantés (P) et non plantés (NP) (UPGMA, « Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean »).**

La comparaison des profils témoin essentiellement de la différence entre le sol à son état initial (t<sub>0</sub>) et après expérimentation (Figure 58). Cette analyse confirme les résultats illustrés par les dénombrements bactériens (différences peu marquées entre pots non plantés et plantés) et par conséquent l'importance relative du traitement du sol avant expérimentation. L'impact rhizosphérique se manifeste toutefois par la mise en évidence de deux souches dominantes (n°1 et n°2, Figure 58, tableau 30) retrouvées uniquement à la suite des extractions d'acides nucléiques de sol des microcosmes plantés.

**Tableau 30 : Affiliation phylogénétique des bactéries indiquées à la Figure 58 basée sur l'analyse des séquences géniques d'ADNr 16S réamplifiés à partir des bandes de TTGE.**

Bande TTGE	Classification phylogénétique	Identification RDP	Séquence homologue la plus proche
1	<i>Acidobacteria</i>	S000040735	<i>agricultural soil bacterium</i>
2	<i>Deltaproteobacteria</i>	S001606895	<i>uncultured Desulfuromonadaceae</i>
3	<i>Acidobacteria</i>	S000040899	<i>Actinomycetales MC9</i>
4	<i>Actinobacteria</i>	S000034202	<i>Nocardioideae Aeromicrobium uncultured actinomycete</i>

L'identification moléculaire de quatre bandes de TTGE majoritaires permet de confirmer :

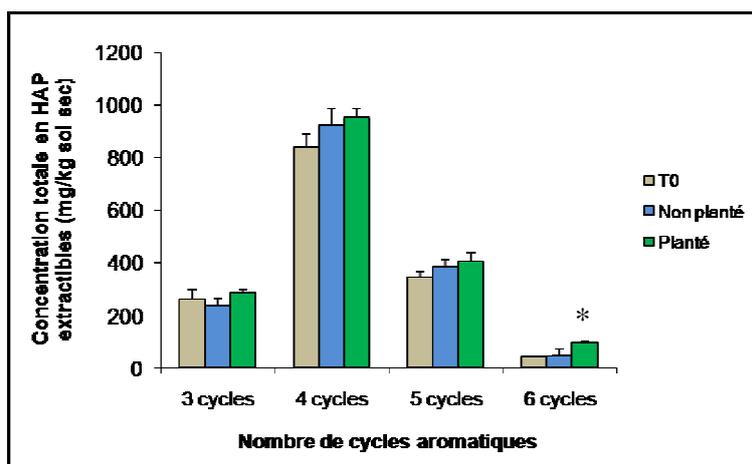
- l'émergence de deux phylotypes affiliés au compartiment rhizosphérique : *Acidobacteria* sp. (n°1) et *Desulfuromonadaceae* (n°2) (Tableau 30). La redondance du genre *Acidobacteria* (*Acidobacteria\_Gp1* sp. Tableau 22), tend à confirmer l'impact

des exsudats racinaires de MxG sur la sélection de souches bactériennes au niveau rhizosphérique. Par ailleurs, le genre *Desulfuromonadaceae* trouvé ici a récemment été mis en évidence dans les phénomènes de minéralisation des HAP en conditions réductrices (Siegert et al., 2010).

- la persistance de « souches communes » (souches n°3 et 4, Tableau 30) entre les différents échantillons de sol ( $t_0$ , non planté et planté), en relation avec leur répartition géographique (souche n°3 *Acidobacteria-sol d'Allemagne*) et leur capacité de dégradation des composés aromatiques (souche n°4 *Aeromicrobium-bioréacteur de dégradation de chlorophénol*) (Tableau 30); rappelant ainsi la nature du sol analysé, *i.e.* sol H1 du nord de la Lorraine, fortement pollué en HAP (1480 mg/kg sol sec).

### III.2.6.1.2. Evolution des teneurs en HAP

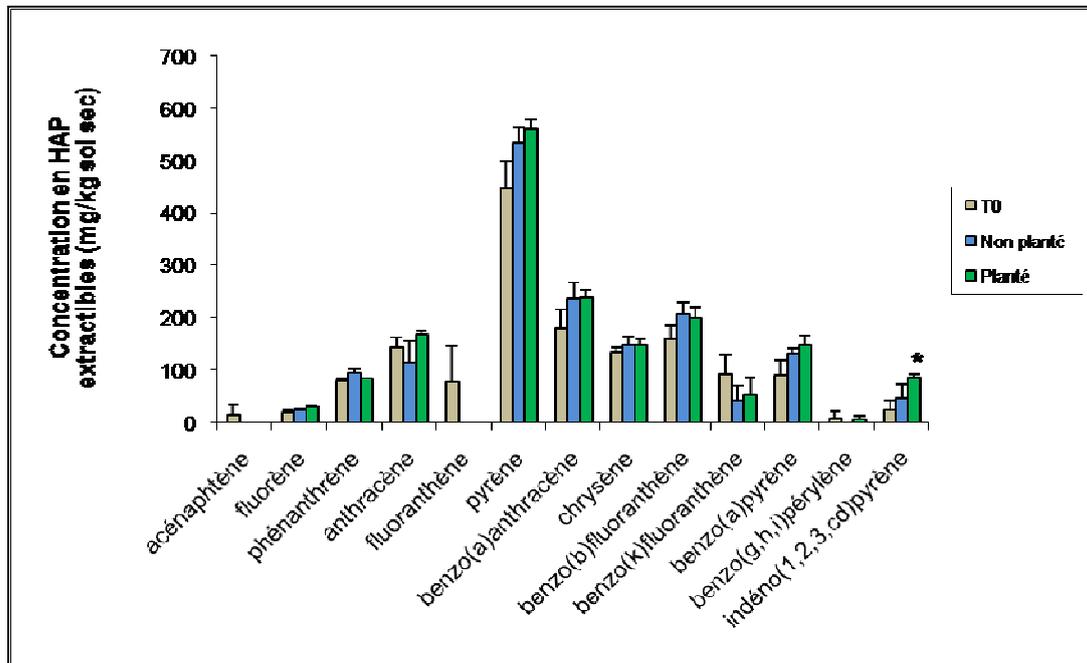
La figure 59 illustre l'évolution des teneurs globales en HAP classés selon leur nombre de cycles, en fonction des modalités « planté » et « non planté ».



**Figure 59** : Concentrations totales en différentes classes de HAP extractibles à l'hexane (3 à 6 cycles) dans le sol de friche H1, au temps initial ( $t_0$ ) et après expérimentation dans les pots non plantés et plantés; valeurs moyennes (mg/kg sol sec)  $\pm$  erreur type ( $n = 4$ ). Différence significative indiquée par « \* » par rapport au témoin  $t_0$ .

Aucune variation significative n'est observée pour les HAP jusqu'à 5 cycles, quelles que soient les modalités considérées (Figure 59). Les HAP composés d'un nombre de cycles supérieur à 3 sont généralement plus récalcitrants à la biodégradation (Bamforth & Singleton, 2005; Bossert & Bartha, 1986; Kästner, 2008; Shuttleworth & Cerniglia, 1995). Toutefois, on note une augmentation sensible des teneurs moyennes en HAP pour chaque cycle dans les pots plantés par rapport aux témoins non-plantés et au sol à  $t_0$ . Elle devient significative pour les HAP à 6 cycles par rapport aux concentrations mesurées à  $t_0$  (Figure 59,  $P < 0,05$ ). Ces observations pourraient paraître contradictoires avec « l'effet rhizosphérique » décrit dans la

littérature et qui conduit à la rhizodégradation des hydrocarbures (Dietz & Schnoor, 2001; Gerhardt et al., 2009). Cependant, des résultats similaires ont déjà été mentionnés dans diverses études (Bengtsson et al., ; Liste et al., 2000; Qiu et al., 1997). Afin d'apporter des éléments d'interprétation supplémentaires, l'analyse plus précise des teneurs individuelles des 13 HAP initialement détectés dans ce sol a été réalisée (Figure 60).



**Figure 60 : Concentrations individuelles en HAP extractibles à l'hexane dans le sol H1 : au temps initial ( $t_0$ ) et après expérimentation dans les pots non plantés et plantés; valeurs moyennes (mg/kg sol sec)  $\pm$  erreur type ( $n = 4$ ). Différence significative indiquée par « \* » par rapport au témoin  $t_0$ .**

Ces résultats indiquent que seule la concentration moyenne en indéno(1,2,3, cd)pyrène est significativement plus élevée dans les sols rhizosphériques par rapport à  $t_0$  (Figure 60). De manière générale, une partie des HAP a pu être remobilisée suite au traitement du sol depuis son prélèvement sur site, comme énoncé précédemment (Joner et al., 2004). Qiu et ses collaborateurs (1997) ont montré qu'une fraction des composés organiques dérivés des racines (acides organiques des exsudats, mucilage, cellules de la coiffe racinaire...) pouvait en outre augmenter la solubilité et la biodisponibilité des HAP (Qiu et al., 1997). Plus récemment, l'influence d'acides organiques tels que l'acide citrique et l'acide oxalique a été démontrée sur la désorption du phénanthrène et du pyrène (Gao et al.). La matière organique dissoute dans la solution du sol participerait aussi à la solubilisation des micropolluants (Raber et al., 1997).

*La pénétration du sol par les racines de MxG et l'exsudation racinaire semblent favoriser la remobilisation de certains HAP lourds initialement présents et probablement*

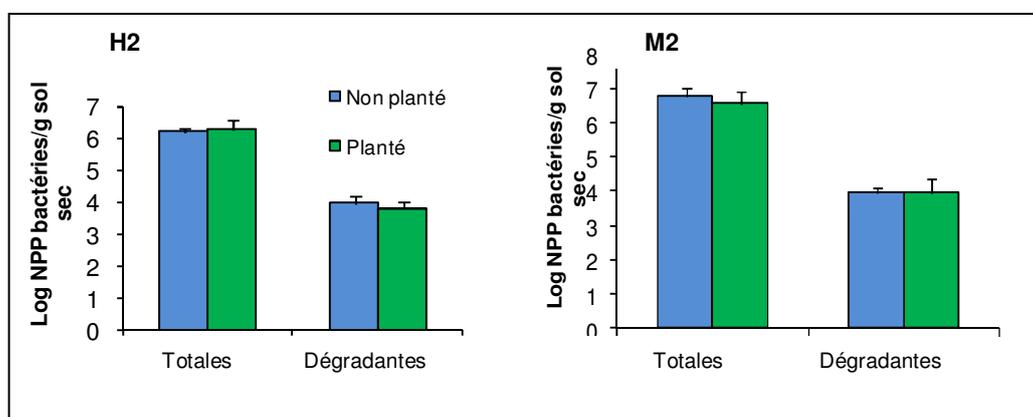
*peu disponibles, masquant leur biodégradation. L'allongement de la durée de culture paraît nécessaire pour vérifier la dissipation des contaminants à moyen terme, la fraction de HAP « lourds » étant généralement plus récalcitrante à la biodégradation (Bamforth & Singleton, 2005; Bossert & Bartha, 1986; Kästner, 2008; Shuttleworth & Cerniglia, 1995)).*

### **III.2.6.2. Essais en sols de friche contaminés H2 et M2**

La poursuite des essais sur une durée plus longue (4,5 mois au lieu de 3 mois) et dans des sols à contamination en HAP moins importante a été menée afin de vérifier la rhizodégradation des polluants en présence de MxG. Plusieurs études ont en effet reporté la dissipation rhizosphérique des HAP à haut poids moléculaire sur des durées s'étalant de 3,5 à 12 mois (Euliss et al., 2008; Joner et al., 2004).

#### **III.2.6.2.1. Dénombrement de la microflore totale et dégradante**

L'effet rhizosphérique le plus notable quel que soit le type de sol ou la durée de culture demeure l'apport de composés organiques facilement assimilables par les bactéries du sol *via* les exsudats racinaires (Barber & Lynch, 1977). Afin de vérifier l'impact de la rhizosphère de MxG sur la microflore du sol, les dénombrements de bactéries totales et dégradantes cultivables ont été conduits sur les sols H2 et M2 (Figure 61).



**Figure 61 : Dénombrement des bactéries cultivables totales et dégradantes dans les microcosmes des sols H2 et M2, non plantés et plantés après 4,5 mois de culture.**

Les populations bactériennes cultivables totales sont en moyenne 2,7 fois plus importantes dans le sol M2 que dans le sol H2 (Figure 61). Cette observation est à mettre en relation avec la texture plus marquée en limons et en argiles de ce sol (S : 66%, L : 20%, A : 14%, tableau 1) ainsi qu'avec la teneur en C.O.T plus élevée (11,5% C.O.T pour M2 contre 8,5% pour H2, tableau 1) (Amellal et al., 2001; Andreoni et al., 2004; Uhlírová & Santrucková, 2003). En revanche, la taille des populations bactériennes dégradantes entre

chaque sol est similaire, de l'ordre de  $10^4$  bactéries dégradantes/g de sol sec (Figure 61) ce qui induit un pourcentage moyen de bactéries dégradantes de 0,4% dans le sol H2 contre 0,2% dans le sol M2 (« non planté » et « planté » confondus), témoignant d'une concentration résiduelle en HAP plus faible dans ce dernier sol.

De plus, les dénombrements n'indiquent pas de différence significative parmi les bactéries totales et dégradantes quelque soient les modalités concernées (« non planté » et « planté », Figure 61) et les types de sol (H2 Figure 61 A et M2 Figure 61 B). De la même manière qu'avec le sol H1, il n'y a pas d'augmentation spécifique des populations cultivables dégradantes en présence de MxG (Figure 61).

#### ***III.2.6.2.2. Diversité des communautés bactériennes***

Les précédentes analyses moléculaires basées sur la technique de PCR-TTGE des ADNr 16S avaient mis en évidence la sélection de certaines populations bactériennes au niveau rhizosphérique dans les sols standard A3 et de friche H1. Des analyses similaires ont donc été reconduites à partir d'échantillons de sol H2 et M2 (état initial ( $t_0$ ), pots plantés et non plantés; Figure 62) ainsi que d'échantillons de rhizoplane, *i.e.* directement à l'interface sol-racine, afin de confirmer la stimulation de populations bactériennes spécifiques au niveau rhizosphérique.

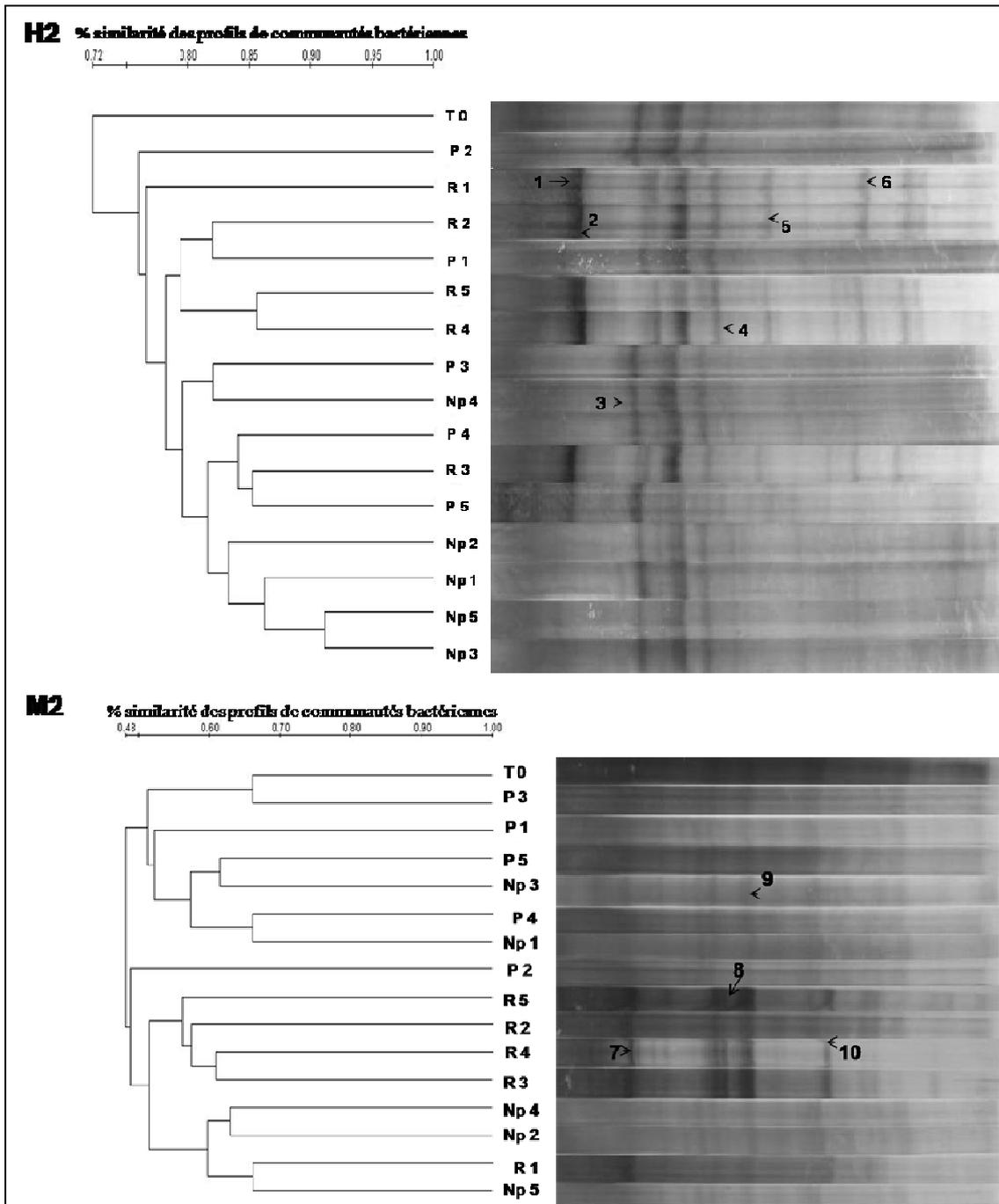


Figure 62 : Comparaison des profils de diversité bactérienne des sols H2 et M2 au temps initial ( $t_0$ ), et après expérimentation dans les pots non plantés et plantés (UPGMA, « *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean* »). Np : non planté, P : planté, R : rhizoplane.

L'identification de bandes de TTGE figurant des phylotypes majoritaires incluant notamment ceux spécifiques à la modalité « planté » est reportée au Tableau 31.

**Tableau 31 : Affiliation phylogénétique des bactéries des sols H2 et M2 indiquées à la Figure 62 basée sur l'analyse des séquences géniques d'ADNr 16S réamplifiés à partir des bandes de TTGE.**

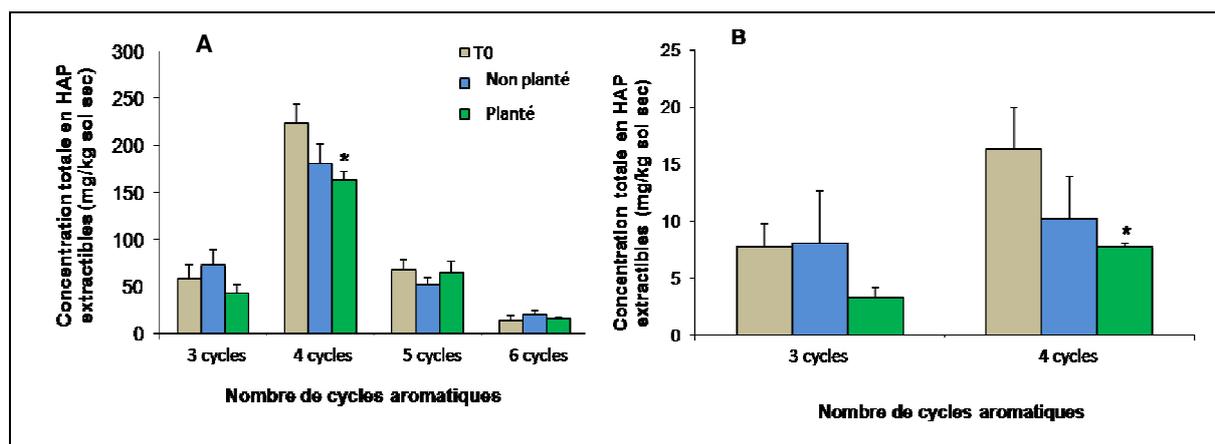
Bande TTGE	Classification phylogénétique	Identification RDP	Séquence homologue la plus proche
1	<i>Cyanobacteria</i>	S000771310	<i>uncultured Streptophyta PSI_05B</i>
2	<i>Bacteroidetes</i>	S000026467	<i>uncultured flexibacterium Sva0755</i>
3, 4, 7	<i>Deltaproteobacteria</i>	S001606895	<i>uncultured Desulfuromonadaceae</i>
5	<i>Cyanobacteria</i>	S000629624	<i>uncultured Streptophyta RB45-20</i>
6	<i>Acidobacteria</i>	S000023605	<i>unidentified Acidobacteria_Gp1 TM29</i>
8	<i>Bacteroidetes</i>	S000041061	<i>uncultured Cytophagales Sphingobacterium</i>
9	<i>Planctomycetales</i>	S000050610	<i>uncultured Planctomycetales bacterium</i>
10	<i>Gammaproteobacteria</i>	S000030455	<i>uncultured Alteromonas</i>

De manière générale, quels que soient les sols, les profils de diversité issus des échantillons de sols plantés ou non sont similaires (cladogrammes de la Figure 62). Les extractions d'ADN de sol ont été réalisées par la suite au niveau du rhizoplane, à l'interface directe sol-racine de MxG. Dans cette situation, certaines souches ont pu être mises en évidence au niveau des pots plantés. Il s'agit des souches n°1, 2, 5, 6 pour le sol H2 ainsi que 8 et 10 pour le sol M2 (Figure 62). Un phylotype apparenté au genre *Acidobacter* (*Acidobacteria\_Gp1*) est à nouveau mis en évidence en relation avec les racines de MxG (bande n°6, Tableau 31). Les phylotypes n°1 et 5 du sol H2, et le n°10 du sol M2, apparentés à des clones dont l'origine rappelle la relation directe avec les végétaux d'une part et le caractère opportuniste d'autre part (phylotype n°10 affilié aux  $\delta$  *proteobacteria*) tendent également à confirmer l'impact des exsudats racinaires sur la sélection de communautés bactériennes au niveau rhizosphérique (apports d'exsudats ou composés rapidement assimilables, favorisant la croissance de souches à stratégie « r »). La présence du phylotype proche de la famille des *Desulfuromonadaceae* aussi bien dans le sol H2 que M2 (Tableau 31) indique sa large répartition au niveau du site suggérant son implication dans les phénomènes de biodégradation et/ou résistance aux contaminants (HAP et métaux). Cette hypothèse serait renforcée par la mise en évidence de cette souche après culture au niveau du sol rhizosphérique dans H1 fortement contaminé en HAP (Figure 62). La quantification et la comparaison des teneurs en HAP extractibles (à l'hexane) après expérimentation en sol « non

planté » et « planté » ont par la suite été réalisées afin de vérifier l'impact de MxG sur la dissipation des polluants.

### III.2.6.2.3. Dissipation des HAP dans les sols de friche après culture

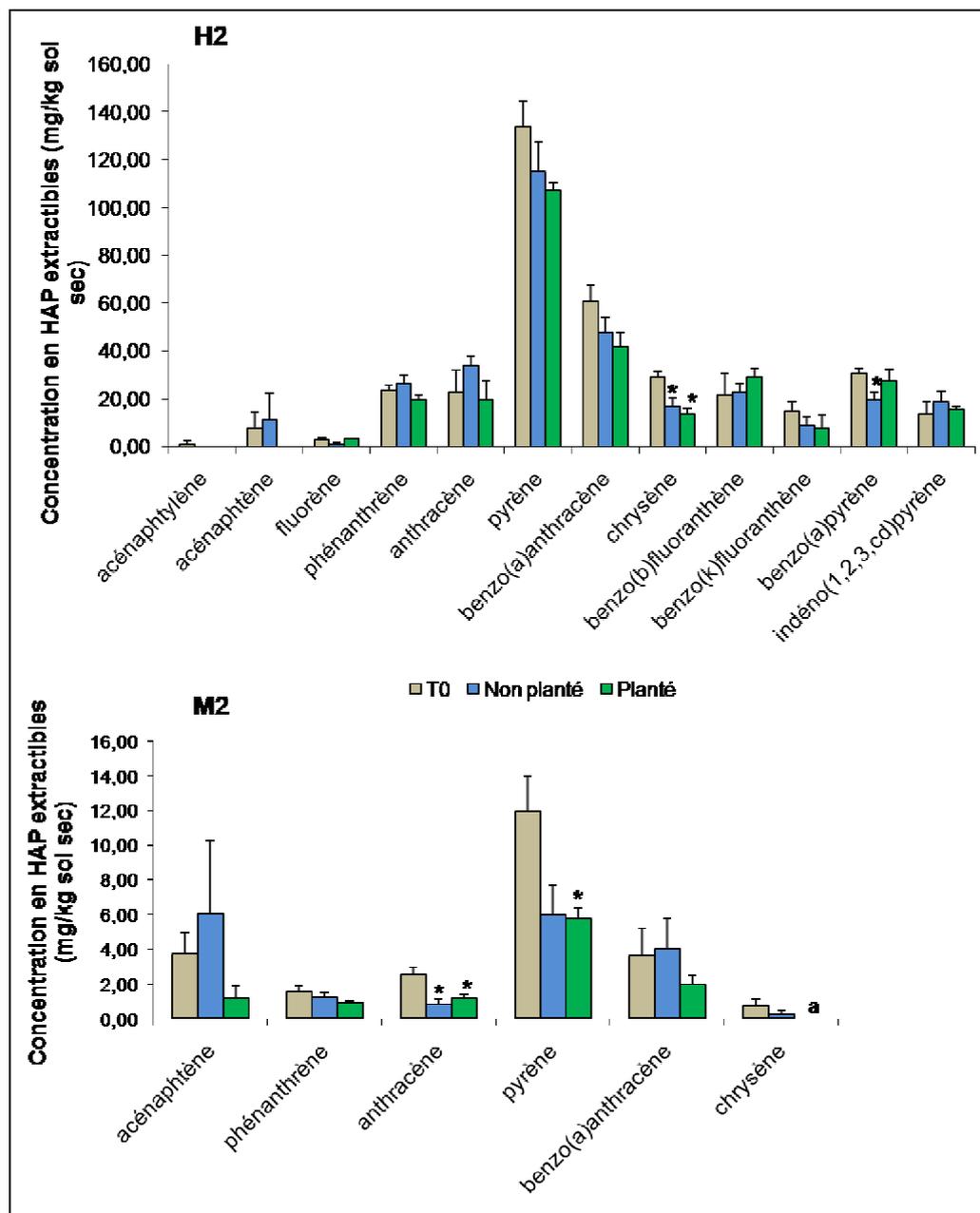
L'origine de la contamination des sols - friche industrielle où les activités ont cessé il y a 30 ans - indique qu'il s'agit de substrats « vieillis » où les polluants seraient majoritairement présents sous forme non-biodisponible (Nam et al., 1998). Compte tenu du profil de contamination des sols H2 et M2, à prédominance en molécules à 4 cycles et plus (Tableau 15 et Figure 21), les phénomènes de dissipation des HAP par volatilisation, à l'exception de l'acénaphthylène (2 cycles), et de bioaccumulation par les plantes peuvent être négligés (Bojes & Pope, 2007; Gao & Zhu, 2004; Reilley et al., 1996). Il en est de même pour la lixiviation, l'apport en eau étant de l'ordre de 70% de la capacité de rétention d'eau des sols durant les essais en microcosmes. La Figure 63 illustre l'évolution des teneurs globales en HAP classés selon leur nombre de cycles, respectivement dans les sols H2 et M2.



**Figure 63 : Concentrations totales en différentes classes de HAP extractibles à l'hexane dans les sols de friche H2 (A) et M2 (B) en mg/kg sol sec, au temps initial ( $t_0$ ) et après expérimentation dans les pots non plantés et plantés; valeurs moyennes  $\pm$  erreur type ( $n = 5$ ). Différences significatives indiquées par « \* » par rapport à  $t_0$ .**

Concernant les HAP « légers » (moins de 4 cycles), on note une diminution des teneurs par rapport à  $t_0$  en situation plantée, à la fois dans les sols H2 et M2, indiquant globalement un impact de la rhizosphère sur la dissipation des contaminants (Figure 63). Cette diminution devient significative pour les HAP à 4 cycles dans les deux sols (Figure 63, a :  $p < 0,05$ ). De l'ordre de 25 % de la teneur initiale pour le sol H2 (Figure 63), elle est plus marquée pour le sol M2 (diminution d'environ 50 % de la teneur en HAP à 4 cycles) (Figure 63 B) initialement moins contaminé que H2. La comparaison des concentrations individuelles en HAP extractibles détectés dans les sols H2 et M2 est illustrée à la Figure 64. Aucune

variation significative n'est observée pour les HAP à 5 et 6 cycles. Ces HAP à « hauts poids moléculaires » sont généralement plus récalcitrants à la biodégradation du fait de leur faible solubilité et biodisponibilité, en particulier dans les sols où la teneur en C.O.T dépasse les 5% (P/P) (Bamforth & Singleton, 2005; Bossert & Bartha, 1986; Kästner, 2008; Shuttleworth & Cerniglia, 1995).



**Figure 64 : Concentrations individuelles en HAP extractibles à l'hexane dans les sols de friche H2 (A) et M2 (B) en mg/kg sol sec, au temps initial (t0) et après expérimentation dans les pots non plantés et plantés; valeurs moyennes ± erreur type (n = 5). Différences statistiques indiquées par : \* : par rapport à t0; a : par rapport aux groupes non marqués.**

Concernant le sol H2, la diminution des teneurs en HAP à 4 cycles observée à la fois dans les modalités « plantés » et « non plantés » à la Figure 63 s'explique par une dissipation

systématique des trois HAP concernés (pyrène, benzo(a)anthracène et chrysène; Figure 64). Elle est significative pour le chrysène par rapport à  $t_0$  à la fois pour les pots non plantés et plantés, avec une dissipation complète dans les pots plantés (Figure 64, \* :  $p = 0,005$ ). On note également une diminution significative des teneurs en benzo[a]pyrène mais uniquement en situation « non planté » (Figure 64). Certains HAP comme l'acénaphthylène et l'acénaphthène, détectés à faibles concentrations à  $t_0$  ( $< 10$  mg/kg sol sec) sont totalement dissipés après culture (Figure 64). Ces résultats suggèrent davantage une dissipation naturelle de ces polluants (volatilisation, séquestration dans les agrégats de sol).

Dans le sol H2, la différence moyenne des teneurs résiduelles entre « non planté » et « planté » pour le pyrène (4 cycles) n'est significative que par rapport à  $t_0$  (Figure 64), traduisant la présence de bactéries à capacité de dégradation de cette molécule, celles-ci étant fréquemment répandues dans les sols (Günther et al., 1996; Johnsen & Karlson, 2005). Il est intéressant de souligner en revanche que pour le chrysène (molécule cancérigène), la dissipation en présence de MxG est complète, cette molécule n'ayant été détectée dans aucun échantillon de sol issu des cultures. La rhizoremédiation par MxG apparaît dans le cas présent comme une méthode de traitement des sols pollués prometteuse à la fois de par la dissipation des pollutions diffuses et de par la capacité de la plante à se développer sur un support multicontaminé (contamination en HAP, en métaux et composés cyanourés).

*Les essais en microcosme ont montré qu'en situation de sol artificiellement contaminé, la biodégradation des HAP lourds tels que le pyrène est particulièrement favorisée par la bioaugmentation en bactéries dégradantes. L'exsudation racinaire permet en outre le maintien des communautés bactériennes autochtones et dégradantes. En situation de sols de friche, où il s'agit d'une pollution ancienne et parfois diffuse, le développement de la rhizosphère de MxG tend à augmenter dans un premier temps la disponibilité des HAP extractibles (à l'hexane). Ce phénomène pourrait s'expliquer à la fois par la destructuration physique des agrégats de sol, liée à la pénétration racinaire et par l'existence de sécrétions favorisant la dissolution des composés hydrophobes (exsudats, mucilage (Nguyen, 2003)). L'amélioration de la disponibilité des HAP dans les sols masquant vraisemblablement leur biodégradation, l'allongement de la durée des cultures en microcosmes a en revanche permis de mettre en évidence la diminution significative des teneurs en HAP en 4 cycles et des tendances observables pour les HAP à 3 cycles. En définitive, l'effet des exsudats sur le maintien de souches dégradantes, montré durant les tests in vitro, a pu être vérifié en situation de microcosmes, de même que le développement*

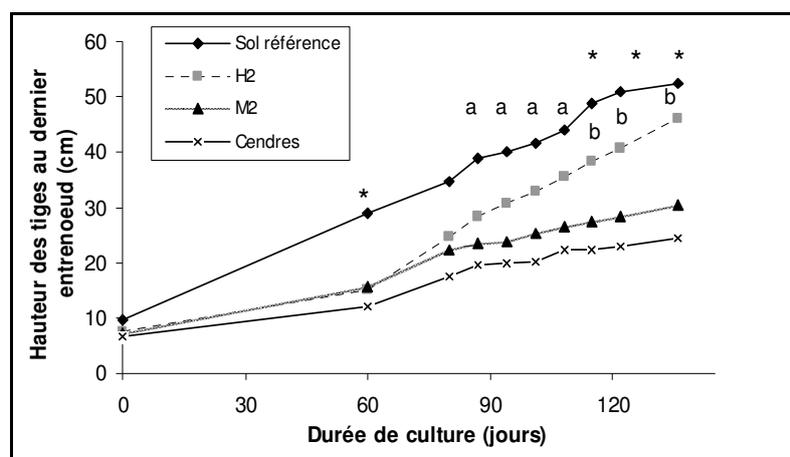
*d'interactions spécifiques plantes-bactéries conduisant à la présence de souches inféodées au compartiment rhizosphérique. Ces populations bactériennes (dont le rôle exact reste à déterminer) sont probablement impliquées dans l'adaptation de la plante aux différents substrats, du fait de leur association étroite avec les racines (rhizoplane).*

### **III.2.7. Développement de MxG dans les sols**

Le suivi de la croissance de MxG dans les cendres (Técher et al., 2012b) a été réalisé au cours des cultures en microcosmes en laboratoire par rapport à un sol de « référence » (Figure 66). L'impact du développement de la rhizosphère vis-à-vis des nutriments du sol a également été évalué.

#### **III.2.7.1. Croissance des tiges**

La pérennité des programmes de phytoremédiation, technique nécessitant plusieurs mois (voire années) comme il a pu être indiqué au cours des essais en microcosmes, nécessite la mise en place de moyens de revalorisation directe des sols traités. Outre les aspects relatifs à la dissipation des polluants, la réutilisation de la biomasse produite après développement des végétaux ainsi que l'impact qui en résulte sur la qualité des sols pourraient offrir sur le long terme de réelles perspectives de réhabilitation des sites. Ces deux aspects, production de biomasse et amélioration de la qualité des sols, ont été abordés à travers le suivi comparatif de la croissance de MxG en sols de friche pollués (H2 et M2) ou à faible valeur agronomique (cendres volantes).



**Figure 65 :** Croissance de *Miscanthus x giganteus* en fonction des types de sols : sol de « référence », sols de friche contaminés H2, M2 et cendres volantes (période de 136 jours de culture). Différences significatives indiquées par : \* : entre sol de référence et les trois autres sols; a : entre sol de référence et [M2, cendres]; b : entre H2 et M2.

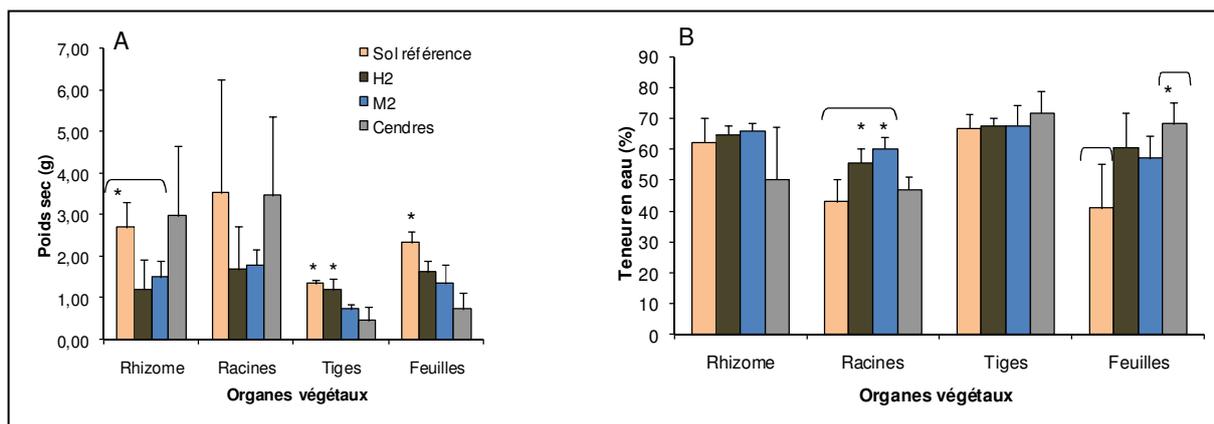
A  $t_0$ , il n'y a aucune différence significative entre les différents individus transplantés : la pré-germination des rhizomes à l'étuve phytotronique a permis la sélection de lots de plantes de taille homogène. De plus, la totalité des individus mis en terre a survécu et s'est développée tout au long de la période de culture, quels que soient les types de sols et malgré le stress de la transplantation, soulignant les capacités d'adaptation de MxG.

Au bout de 60 jours de culture, on note une croissance significativement plus importante dans le sol de « référence » par rapport aux trois autres sols (Figure 65, \* :  $p < 0,05$ ). Après cette première « phase » de croissance, on note une augmentation sensible des taux de croissance jusqu'à 80 jours (pente relative des courbes à la Figure 65), donnant lieu à des tailles homogènes (pas de différence significative) entre les plantes des différents sols (Figure 65). Puis, le taux de croissance s'infléchit sensiblement pour les plantes du sol M2 et des cendres, alors qu'il reste constant pour celles du sol H2. En fin de culture, la hauteur des tiges est significativement plus grande pour les plantes de ce dernier sol par rapport à celles de M2, ce qui témoignerait dans M2 d'un impact toxique des métaux sur la croissance du végétal (Figure 65, b :  $p < 0,05$ ).

Dans les cendres, la hauteur finale des tiges atteint presque la moitié de celle mesurée chez les plantes du sol de « référence » (Figure 65), ce qui confirmerait les carences en nutriment (notamment en potassium) de ce substrat.

### ***III.2.7.2. Biomasse et hydratation***

Afin d'apporter quelques éléments d'interprétation supplémentaires à la croissance différentielle observée entre les plantes issues des sols de « référence », des cendres, et des sols contaminés H2 et M2, la biomasse des organes souterrains et aériens, ainsi que leur composition en eau ont été évaluées (Figure 66). Les parties aériennes (tiges) constituent la biomasse directement revalorisable après culture alors que les parties souterraines (rhizomes) sont impliquées dans la translocation et le stockage des nutriments de la plante (azote, phosphore) garants de la reprise de croissance à la saison suivante (Lewandowski et al., 2003).



**Figure 66 : Poids sec (A) et teneur en eau (B) des différentes parties végétales après croissance en sol de référence, sols de friche contaminés H2, M2 et cendres. Différences significatives indiquées par \* par rapport aux groupes non marqués (éventuellement indiqués par des accolades).**

L'analyse de la biomasse souterraine témoigne d'un développement des rhizomes significativement plus important en sol de référence par rapport aux sols contaminés H2 et M2 (Figure 66 A, \* :  $p < 0,05$ ). Toutefois, la production de racines est identique.

Pour les cendres, les biomasses rhizomales et racinaires sont similaires à celles relevées dans le sol de « référence » (Figure 66 A). Dans un contexte de plantation *in situ* ces résultats laisseraient présager d'une installation et d'un développement pérennes de MxG dans le parc à cendres.

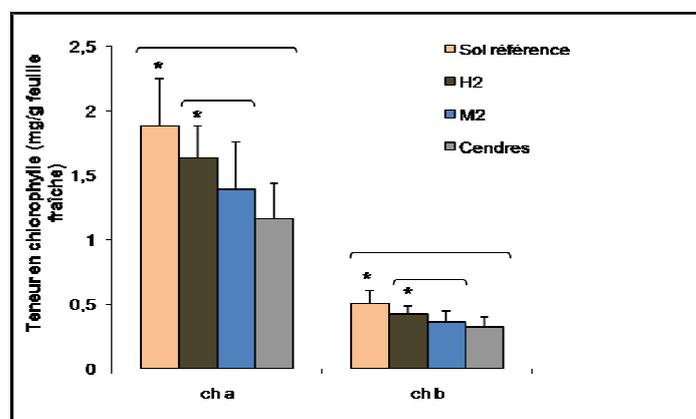
Concernant les feuilles, une différence significative de développement est observée entre les plantes du sol de « référence » et celles des sols H2, M2 et des cendres (Figure 66 A, \* :  $p < 0,05$ ), à mettre en relation avec la croissance significativement moins importante des plantes dans ces sols.

Néanmoins, il est intéressant de souligner que l'évaluation des taux d'hydratation des différentes parties souterraines et aériennes, de l'ordre de 60% dans les sols de friches et cendres (excepté pour les racines des cendres à 50% de teneur en eau) n'indique pas de problème de turgescence des différents organes végétaux (Figure 66 B). La teneur en eau des racines issues des sols H2 et M2 étant même significativement supérieure à celle des racines issues du sol de « référence », de même que la teneur en eau des feuilles des plantes poussées sur cendres (toujours par rapport au même sol, Figure 66 B, \* :  $p < 0,05$ ).

**En résumé, malgré une croissance aérienne variable en fonction des substrats, les plantes se sont adaptées aux conditions physico-chimiques des différents sols.**

### III.2.7.3. Teneurs en chlorophylle

Afin de vérifier l'adaptation des plantes aux divers substrats, les teneurs en chlorophylle ont été évaluées en tant que descripteur physiologique intégrant à la fois la toxicité et les carences potentielles des sols en nutriments (Soil Survey Division Staff, 1993).



**Figure 67 : teneurs en chlorophylle a (ch a) et b (ch b) des feuilles des plantes en fonction du substrat de culture : sol de « référence », sols de friche contaminés H2, M2 et cendres volantes, r : ratio (ch a/ch b). Différences significatives indiquées par \* par rapport aux groupes non marqués (éventuellement indiqués par des accolades).**

Les plantes cultivées sur les sols contaminés (H2 et M2) et dans les cendres présentent des déficits chlorophylliens par rapport à celles issues du sol de « référence » (Figure 67, \* :  $p < 0,05$ ). Les différences de croissance observées au niveau des tiges (Figure 65) peuvent être mises en parallèle avec les teneurs en chlorophylle des plants de MxG. Ces dernières, moins importantes pour les plantes en sols pollués (H2 et M2) peuvent indiquer une légère toxicité des substrats, davantage marquée pour M2 aux concentrations plus élevées en métaux et cyanures (Tableau 27). Cet état peut également résulter d'une carence en phytonutriment et, concernant les cendres, d'un stress supplémentaire probablement dû à la nature silico-alumineuse du substrat (Haynes, 2009; Nirmala et al., 1995).

## III.2.8. Impact de la culture de MxG sur la qualité des sols

### III.2.8.1. Paramètres physico-chimiques et biologiques

Certains paramètres physico-chimiques des sols de friche ont été évalués après culture de MxG, permettant également de mieux caractériser l'impact de la rhizosphère sur la qualité des sols. Il s'agit du pH, de la conductivité, des teneurs en nutriments (Tableau 32). De manière générale, l'ensemble des paramètres mesurés a évolué à la suite des expérimentations avec ou sans MxG.

**Tableau 32 : pH et conductivité électrique mesurés dans la fraction hydrosoluble des sols après les essais en microcosmes.** Différences significatives indiquées par : \* : par rapport au témoin  $t_0$ , par des lettres minuscules par rapport aux groupes non marqués.

Modalités	pH (eau ultrapure)					Conductivité ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )				
	Sols contaminés			Sols non contaminés		Sols contaminés			Sols non contaminés	
	H1	H2	M2	CDR	Sol Réf.	H1	H2	M2	CDR	Sol Réf.
$t_0$	7,79 $\pm 0,10$	8,06 $\pm 0,03$	8,04 <sup>a</sup> $\pm 0,03$	8,03 $\pm 0,09$	7,16 $\pm 0,19$	144 $\pm 16$	189 <sup>a</sup> $\pm 24$	407 $\pm 3$	106 $\pm 3$	182 $\pm 42$
<b>Non planté</b>	7,83 $\pm 0,28$	8,20 $\pm 0,10$	7,89 $\pm 0,09$	8,00 $\pm 0,08$	-	269* $\pm 40$	101 $\pm 6$	432 $\pm 31$	138* $\pm 17$	-
<b>Planté</b>	8,09 <sup>a</sup> $\pm 0,11$	8,14 $\pm 0,13$	7,86 $\pm 0,05$	8,13 $\pm 0,09$	7,48* $\pm 0,09$	206* $\pm 15$	94 $\pm 11$	501* $\pm 50$	138* $\pm 7$	147 $\pm 9$

On note une augmentation significative du pH dans le sol de friche rhizosphérique H1 après culture (Tableau 32, a :  $p < 0,05$ ). En revanche, dans le sol M2, une baisse sensible mais significative du pH est relevée dans les pots plantés et non plantés (Tableau 32, a :  $p < 0,05$ ). Toutefois, il n'y a pas de différence marquée entre les pots plantés et non plantés dans ce sol. Cette légère acidification est susceptible de remobiliser partiellement certains métaux initialement présents sous forme d'oxydes et d'entraîner une augmentation de toxicité du sol (Foy et al., 1978). Cette hypothèse permettrait d'expliquer la croissance plus faible des plantes observée dans M2 (Figure 66).

Aucune variation de pH n'est enregistrée dans les cendres, alors qu'une alcalinisation, au contraire, est notée dans le sol de « référence » après culture (Tableau 32, \* :  $p < 0,05$ ).

Une augmentation significative de la conductivité des lixiviats de sol est reportée pour les sols H1 (« non planté » et « planté »), M2 (« planté ») ainsi que pour les cendres (« non planté » et « planté ») (Tableau 32, \* :  $p < 0,05$ ). L'activité microbienne et la pénétration racinaire peuvent avoir favorisé la dissolution de certains sels ou la dégradation partielle de composés amorphe (dans les cendres en particulier), entraînant également la libération de sels dans le milieu. A l'inverse, une diminution significative de la conductivité s'observe pour le sol H2, à la fois dans les pots plantés et non plantés par rapport à  $t_0$ , ce qui souligne une fois de plus la spécificité de chaque type de sol.

Les teneurs en carbone organique influant directement sur la taille et l'activité de la microflore dans les sols, ce paramètre a été le premier évalué parmi les composés biologiquement assimilables (Tableau 33).

**Tableau 33 : Carbone organique dissout (C.O.D) mesuré dans la fraction hydrosoluble des sols après les essais en microcosmes (mg/g sol sec). Différences significatives indiquées par des lettres minuscules par rapport aux groupes non marqué : a : par rapport aux deux autres groupes considérés, b : par rapport à la modalité « non planté ».**

Modalités	Carbone organique dissout (C.O.D) (mg/g sol sec)				
	Sols contaminés			Sols non contaminés	
	H1	H2	M2	Cendres	Sol Réf.
<b>t<sub>0</sub></b>	6,92 ± 0,77 <sup>a</sup>	4,46 ± 0,09 <sup>a</sup>	4,31 ± 0,15 <sup>b</sup>	4,16 ± 1,16	18,83 ± 1,43 <sup>a</sup>
<b>Non planté</b>	5,44 ± 0,15	3,90 ± 0,14	3,84 ± 0,15	5,87 ± 1,48	-
<b>Planté</b>	5,75 ± 0,17 <sup>b</sup>	4,06 ± 0,11 <sup>b</sup>	4,15 ± 0,51	6,12 ± 1,42 <sup>a</sup>	10,64 ± 0,93

La teneur en C.O.D diminue par rapport à t<sub>0</sub> quelles que soient les modalités « planté » et « non planté » en situation de sols contaminés et pour le sol de « référence » (Tableau 33, a : p < 0,05), indiquant une minéralisation du C.O.D très certainement liée à l'activité microbienne. La teneur en composés organiques réducteurs demeure cependant significativement plus élevée dans les pots plantés par rapport aux pots non plantés dans les sols H1 et H2 (Tableau 33, b : p < 0,05), indiquant un enrichissement des sols en présence de MxG. De même, dans les cendres, la teneur en C.O.D ne varie pas entre l'état initial et les pots non plantés. En revanche, la présence de MxG induit une augmentation significative de composés organiques solubles (Tableau 33, a : p < 0,05 : 6,12 mg/kg sol sec au niveau rhizosphérique contre 4,16 mg/kg à t<sub>0</sub>, soit une augmentation moyenne de 47 %). Ces résultats témoignent de l'apport de composés organiques dû aux racines de MxG, en particulier *via* les phénomènes d'exsudations racinaires (Nguyen, 2003).

Concernant l'analyse de l'azote inorganique (sous forme d'ammonium, de nitrites et de nitrates), le dénombrement de certaines populations bactériennes a d'abord été réalisé. Les dénombrements « non spécifiques » des bactéries totales cultivables et de celles oxydant l'ammonium (comprenant les bactéries nitrifiantes et nitratantes) ont été réalisés dans le sol de « référence » et les cendres (Tableau 34). Les dénombrements des populations bactériennes azotofixatrices libres et nitratantes (oxydant les nitrites) ont été conduits à la fois dans les sols contaminés (H2 et M2) et non contaminés (sol de « référence » et cendres; Tableau 34). Ces populations bactériennes sont susceptibles de promouvoir la croissance du végétal et d'être impliquées (bactéries oxydant les nitrites; Muratova et al., 2003) dans l'oxydation de composés aromatiques (HAP, exsudats). Par conséquent, elles pourraient faire partie des populations mises en évidence spécifiquement au niveau rhizosphérique dans les sols de friche.

**Tableau 34 : Dénombrement des bactéries totales cultivables, nitrifiantes, azotofixatrices libres et nitratantes : dans les sols non contaminés (sol de « référence » et cendres volantes) et sols contaminés (H2 et M2).**

Modalités	Bactéries totales cultivables**		Nitrifiantes ** (AOB)		Azotofixatrices libres *				Nitratantes ** (NOB)			
	Sols non contaminés				Sols contaminés		Sols non contaminés		Sols contaminés		Sols non contaminés	
	CDR	Sol Réf.	CDR	Sol Réf.	H2	M2	CDR	Sol Réf.	H2	M2	CDR	Sol Réf.
<b>Non planté</b>	5,63 ± 0,25	-	4,45 ± 0,66	-	6,02 ± 0,27	6,23 ± 0,10	5,20 ± 0,21	-	4,69 ± 0,34	5,02 ± 0,25	3,11 ± 0,54	-
<b>Planté</b>	5,54 ± 0,09	6,91 ± 0,25	3,99 ± 0,38	5,03 ± 0,74	6,07 ± 0,24	6,15 ± 0,03	5,56 ± 0,49	6,46 ± 0,07	4,21 ± 0,48	4,57 ± 0,33	3,66 ± 0,36	5,53 ± 0,63

\* : bactéries azotofixatrices libres, exprimé en log CFU/g sol sec

\*\* : bactéries nitrifiantes et nitratantes, exprimé en log NPP/g sol sec.

De manière générale, les dénombrements bactériens par méthodes culturales n'ont permis de mettre en évidence aucune différence significative entre les modalités « planté » et « non planté » d'une part, et les différents groupes fonctionnels considérés d'autre part (bactéries totales, azotofixatrices, nitrifiantes et nitratantes) (Tableau 34). On note toutefois que les populations bactériennes cultivables sont en moyenne dix fois moins importantes dans les cendres, indiquant des conditions de vie microbienne plus drastiques dans ce matériau. De fait, l'analyse des profils de diversité bactérienne par méthode moléculaire (PCR-TTGE) a également été réalisée à partir des différents échantillons de cendres (état initial ( $t_0$ ), pots plantés et non plantés, Figure 68), afin de vérifier l'émergence de populations spécifiques au compartiment rhizosphérique.

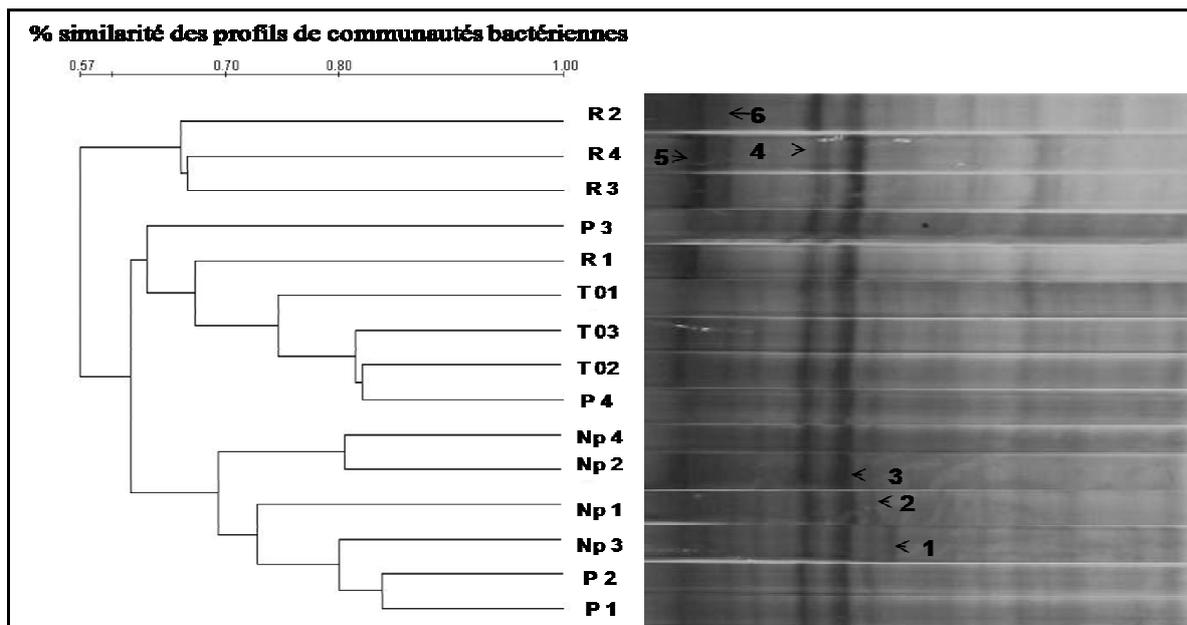


Figure 68 : Comparaison des profils de diversité des communautés bactériennes des cendres au temps initial ( $t_0$ ), et après expérimentation dans les pots non plantés et plantés (UPGMA, « Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean »).

L'identification de bandes de TTGE majoritaires ou spécifiques à la modalité « planté » (bandes n° 5 et n°6, figure 68) est illustrée au Tableau 35.

Tableau 35 : Affiliation phylogénétique des bactéries des cendres indiquées à la Figure 68 basée sur l'analyse des séquences géniques d'ADNr 16S réamplifiés à partir des bandes de TTGE.

Bande TTGE	Classification phylogénétique	Identification RDP	Séquence homologue la plus proche
1	<i>Firmicutes</i>	S000028336	<i>uncultured Geobacillus C4</i>
2	<i>Acidobacteria</i>	S000023342	<i>unidentified Acidobacteria_Gp1 TM13</i>
3, 4	$\delta$ <i>proteobacteria</i>	S001606895	<i>uncultured Desulfuromonadaceae</i>
5	<i>Cyanobacteria</i>	S000629624	<i>uncultured Streptophyta RB45-20</i>
6	<i>Cyanobacteria</i>	S000771310	<i>uncultured Streptophyta PSI_05B</i>

Certains phylotypes identifiés dans les pots plantés et non plantés, ainsi qu'à  $t_0$  s'apparentent à ceux identifiés à partir des sols de friche H1, H2 et M2 (*Acidobacteria\_Gp1* sp., *Desulfuromonadaceae* sp., Figure 68 et Tableau 35) soulignant le caractère ubiquiste de ces bactéries dans les sols de friche étudiés. Une souche liée à des conditions réductrices est de nouveau mise en évidence, *Geobacillus C4* (souche n°1, Figure 68 et Tableau 35), pouvant être liée aux conditions anoxiques résultant de la cimentation des cendres (phénomène particulièrement observé au niveau du parc à cendres). La présence

spécifique des souches n°5 et n°6, mises en évidence également au niveau du rhizoplane dans le sol H2 confirme la sélection de ces souches par la rhizosphère de MxG. Une dynamique nouvelle se met en place au sein des communautés bactériennes rhizosphériques des cendres, se traduisant au niveau du cladogramme par une distinction entre les profils issus de l'analyse du rhizoplane d'une part et ceux issus du substrat d'autre part (Figure 68). La quantification de l'azote inorganique (nitrites et nitrates) a été réalisée par la suite (Tableau 36) dans la mesure où les dénombrements bactériens ne se sont pas révélés suffisamment sensibles pour mettre en évidence des différences significatives entre modalités « planté » et « non planté ».

**Tableau 36 : Nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) et nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) mesurés dans la fraction hydrosoluble des sols après les essais en microcosmes (µg/g sol sec).** Différences significatives indiquées : par \* : par rapport au témoin t<sub>0</sub>, par des lettres minuscules : a : par rapport aux deux autres groupes considérés, b : entre non planté et planté et c : entre t<sub>0</sub> et planté.

Modalités	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/g sol sec)					NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (µg/g sol sec)				
	Sols contaminés			Sols non contaminés		Sols contaminés			Sols non contaminés	
	H1	H2	M2	CDR	Sol Réf.	H1	H2	M2	CDR	Sol Réf.
t <sub>0</sub>	2,7 ± 1,1	6,6 <sup>a</sup> ± 1,4	7,5 <sup>c</sup> ± 0,3	0,4 ± 0,1	1,6 <sup>a</sup> ± 0,3	118,2 ± 16,0	335,1 <sup>c</sup> ± 21,1	367,9 <sup>c</sup> ± 18,7	25,9 <sup>c</sup> ± 1,8	46,3 ± 9,1
Non planté	2,2 ± 0,4	0,9 ± 0,2	6,0 ± 1,8	1,0 <sup>*</sup> ± 0,1	-	663,5 <sup>*</sup> ± 140,0	93,5 <sup>b</sup> ± 30,5	144,6 <sup>b</sup> ± 15,9	41,9 <sup>a</sup> ± 3,9	-
Planté	2,9 <sup>b</sup> ± 0,6	1,1 ± 0,2	5,6 ± 1,3	1,1 <sup>*,b</sup> ± 0,1	1,2 ± 0,5	369,8 <sup>*</sup> ± 131,9	27,0 ± 17,9	11,4 ± 4,4	9,3 ± 2,1	116,8 <sup>*</sup> ± 73,0

En H1, on note une augmentation significative des teneurs en nitrites dans les pots plantés par rapport aux non plantés (Tableau 36, b : p < 0,05). Pour le sol H2 en revanche, une diminution significative des teneurs en nitrites est observée après expérimentation (Tableau 36, a : p < 0,05). Il en est de même avec le sol M2, à l'exception que cette diminution n'est significative que dans les pots plantés par rapport à t<sub>0</sub> (Tableau 36, c : p < 0,05). Ces teneurs plus faibles en nitrites peuvent être dues à l'immobilisation d'une fraction de l'azote, directement assimilé sous forme d'azote organique par les microorganismes des différents sols (bactéries et champignons). Une partie peut aussi avoir été minéralisée durant des processus de dénitrification, ou au contraire été convertie en nitrates, majoritairement assimilables par les plantes.

Dans les sols non contaminés, une situation semblable est relevée avec le sol de « référence » (Tableau 36, a : p < 0,05). Pour les cendres, au contraire, les teneurs en nitrites

augmentent de manière significative (d'un facteur supérieur à deux) dans les cendres plantés et non plantés par rapport aux concentrations initiales (Tableau 36, \* :  $p < 0,05$ ). De plus, cette augmentation est davantage marquée au niveau rhizosphérique (Tableau 36, b :  $p < 0,05$ ). Dans ce substrat aux concentrations initialement très faibles en nitrites ( $0,4 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$  sol sec, Tableau 36), la déstructuration et l'aération successives des agrégats de cendres présentant localement des propriétés pouzzolaniques (cimentation) ont pu être suffisantes pour favoriser le développement de communautés bactériennes impliquées dans la fixation de l'azote atmosphérique (ou sa libération à partir de résidus organiques présents dans le matériau). Ces phénomènes seraient d'autant plus accentués en présence de MxG. En effet, la rhizosphère, à travers notamment l'exsudation racinaire et l'apport concomitant d'énergie organique, agit à la manière d'un « bioréacteur », pouvant favoriser des activités microbiennes spécifiques comme celles de la nitrification, liée au cycle de l'azote.

L'évolution des teneurs en nitrites sont à mettre en relation avec celles des nitrates. En effet, l'azote dans les sols n'est que temporairement « stocké » sous forme de nitrites et rapidement oxydé en nitrates sous l'action des bactéries nitrifiantes (Sprenst, 1987). Dans le sol H1, où les teneurs en nitrates augmentent significativement après expérimentation, en présence et en absence de MxG (Tableau 36, \* :  $p < 0,05$ ), le mécanisme semble vérifié.

Au contraire, dans les sols H2 et M2, on note une réduction significative des taux de nitrates dans les pots plantés à la fois par rapport aux teneurs initiales et par rapport aux pots non plantés (Tableau 36, c, b :  $p < 0,05$ ). Les nitrates constituent la forme chimique de l'azote majoritairement assimilée par les végétaux supérieurs avec les nitrites et certains acides aminés (Schobert et al., 1988). La réduction significative des taux de nitrates dans les sols rhizosphériques est à mettre en parallèle avec la croissance des végétaux (Figure 66).

Concernant les sols non contaminés, l'augmentation significative des taux de nitrates dans les cendres non plantés et dans le sol de « référence » planté par rapport à  $t_0$  va dans le sens de l'hypothèse émise avec H1 (dégradation partielle de résidus organiques). Le sol de « référence » en particulier a été initialement enrichi en tourbe avant d'être stérilisé, ce qui constitue un stock supplémentaire de matière organique minéralisable. La réduction significative des teneurs en nitrates dans les cendres plantés par rapport aux pots non plantés et à  $t_0$  (Tableau 36, a, c :  $p < 0,05$ ) associée à l'augmentation significative en nitrites (Tableau 36, \*, b :  $p < 0,05$ ), suggère une « dynamisation » du cycle de l'azote dans le compartiment rhizosphérique des cendres.

Les bactéries et les plantes étant en compétition pour l'assimilation non seulement de l'azote mais aussi du phosphate et du potassium, les teneurs de ces macronutriments ont aussi été évaluées. Les concentrations en phosphates hydrosolubles dans les sols sont reportées dans le Tableau 37.

**Tableau 37 : Teneurs en phosphates ( $\text{PO}_4^-$ ) mesurés dans la fraction hydrosoluble des sols après les essais en microcosmes ( $\mu\text{g/g sol sec}$ ). Différences significatives indiquées : par \* : par rapport au témoin  $t_0$ , par des lettres minuscules : a : par rapport aux groupes non marqués, b : par rapport à « non planté » et c : entre  $t_0$  et « planté ».**

Modalités	$\text{PO}_4^-$ ( $\mu\text{g/g sol sec}$ )				
	Sols contaminés			Sols non contaminés	
	H1	H2	M2	CDR	Sol Réf.
$t_0$	12,6 <sup>b</sup> ± 2,9	10,45 ± 2,9	0,97 ± 0,3	9,0 ± 0,7	18,2 <sup>a</sup> ± 1,7
Non planté	8,7 ± 1,5	19,87* ± 2,2	1,35 <sup>c</sup> ± 0,5	7,1* ± 0,5	-
Planté	10,6 ± 3,2	19,87* ± 1,4	0,91 ± 0,5	7,8* <sup>b</sup> ± 1,0	10,5 ± 1,6

Concernant le sol contaminé H1, une diminution significative des teneurs en phosphate est reportée dans les pots non plantés par rapport à  $t_0$  (Tableau 37, b :  $p < 0,05$ ). En situation plantée, les teneurs sont similaires (Tableau 37). Pour le sol H2, on note une augmentation significative (d'un facteur deux) à la fois pour les pots non plantés et plantés par rapport à  $t_0$  (Tableau 37, \* :  $p < 0,05$ ). De même, les teneurs sont significativement plus importantes dans le sol M2 non planté (Tableau 37, c :  $p < 0,05$ ) alors qu'elles sont demeurées identiques à  $t_0$  au niveau des sols rhizosphériques (Tableau 37).

Dans les cendres et dans le sol de « référence », on note une diminution significative des teneurs en phosphate en situation non plantée et plantée par rapport à  $t_0$  (Tableau 37, \*, a :  $p < 0,05$ ). Cette diminution peut traduire une assimilation du nutriment par la biomasse microbienne et végétale. Pour les cendres, la diminution est cependant plus marquée dans les pots non plantés par rapport aux pots plantés (Tableau 37, b :  $p < 0,05$ ).

Par ailleurs, étant donné que le développement végétal s'accompagne nécessairement de l'absorption de phosphate au niveau racinaire, le maintien des teneurs en phosphate lixiviable à des valeurs similaires à celles mesurées à  $t_0$  (sols H1 et M2) et dans certains cas égales ou supérieures à celles dans les pots non plantés (H2) indiquerait un effet de la plante sur la solubilisation de ce nutriment. Ce phénomène pourrait résulter de l'exsudation d'acides organiques favorisant la solubilisation du phosphate sous forme d'oxydes de calcium ou de magnésium (Neumann et al., 1999). L'élucidation des mécanismes impliqués nécessite

davantage d'investigations, notamment à travers le dénombrement également des populations bactériennes rhizosphérique à activité solubilisatrice du phosphate (Velázquez et al., 2007). L'augmentation des teneurs rhizosphériques en phosphate est par ailleurs confirmée dans les cendres plantées en comparaison à celles non plantées (Tableau 37).

Enfin, l'évolution des concentrations en oxydes de potassium solubilisés, macronutriment essentiel également à la croissance végétale, a été analysée (Tableau 38).

**Tableau 38 : Teneurs en oxydes de potassium (K<sub>2</sub>O) mesurés dans la fraction hydrosoluble des sols après les essais en microcosmes (µg/g sol sec).** Différences significatives indiquées : par \* : par rapport au témoin t<sub>0</sub>, par des lettres minuscules : a : par rapport aux groupes non marqués, b : par rapport à « non planté » et c : entre t<sub>0</sub> et « planté ».

Modalités	K <sub>2</sub> O (µg/g sol sec)				
	Sols contaminés			Sols non contaminés	
	H1	H2	M2	CDR	Sol Réf.
t <sub>0</sub>	3 ± 0,0	4,1 <sup>a</sup> ± 0,1	4,7 <sup>a</sup> ± 0,1	5,5 <sup>c</sup> ± 0,5	8,8 ± 0,7
Non planté	3,7 <sup>*</sup> ± 0,3	2,00 <sup>b</sup> ± 0,1	4,1 ± 0,3	4,3 ± 2,0	-
Planté	7,7 <sup>*</sup> ± 1,2	1,5 ± 0,2	3,8 ± 0,3	2,3 ± 0,8	5,6 ± 3,8

Pour cet élément, on note une augmentation significative des concentrations dans le sol H1, à la fois dans les pots plantés et non plantés par rapport à t<sub>0</sub> (Tableau 38, \* : p < 0,05). Pour les deux autres sols contaminés en revanche, une diminution significative des teneurs en potassium est systématiquement observée après expérimentation, d'autant plus accentuée en H2 dans les pots plantés que dans ceux non plantés (Tableau 38, a, b : p < 0,05).

Dans les cendres, on note une diminution des teneurs au niveau du sol rhizosphérique mais aucune variation significative n'est observée. Il en est de même pour le sol de « référence » après culture (Tableau 38). On pourrait supposer que, de manière similaire avec le phosphate, une partie des nutriments soit absorbée et assimilée par la biomasse microbienne et végétale, mais que certains mécanismes permettent à la plante d'entretenir la solubilisation et la biodisponibilité de l'élément, nécessaire à sa croissance. Considérant l'impact de MxG sur la composition des lixiviats, la toxicité de cette fraction liquide a été évaluée pour l'ensemble des sols.

### III.2.8.2. Tests de toxicité des lixiviats

Les tests de croissance algale n'ont pas témoigné d'inhibition de croissance, traduisant une absence de toxicité de l'ensemble des lixiviats des sols vis-à-vis des algues (*Pseudokirchneriella subcapitata*) dans les conditions expérimentales (II.2.3.3). Aussi, concernant les cendres, les coefficients de régressions linéaires traduisant la pente des droites de croissance algale ont été analysés en tant qu'indicateur supplémentaire de l'amélioration de leur qualité agronomique (Tableau 39).

**Tableau 39 : Récapitulatif des tests de croissance algale : équations de régression linéaire déterminées à l'issu des 72 h de culture, exprimant le nombre de cellules algales/mL (y) en fonction de la concentration (x) en lixiviat de sol ajouté au milieu de culture algal durant le test; R<sup>2</sup> : coefficient de corrélation linéaire.**

Type de cendres	Equations de régression linéaire de croissance algale	R <sup>2</sup>
T <sub>0</sub>	$y = 553,34x + 254412$	0,58
Non planté	$y = 2999,8x + 297162$	0,90
Planté	$y = 3119,2x + 287131$	0,88

On note une augmentation de la croissance algale avec les lixiviats des pots plantés par rapport à t<sub>0</sub> et aux cendres non plantées, ce qui serait à mettre en relation avec la « dynamisation du cycle de l'azote » et l'altération potentielle des matériaux, conduisant à la libération de nutriments initialement immobilisés sous forme d'oxydes.

*En résumé, la présence de MxG induit une augmentation marquée de carbone organique soluble par rapport aux modalités non plantées, soulignant l'impact de l'exsudation racinaire. Si les conséquences sur la taille des communautés bactériennes cultivables n'ont pu être montrées de manière significative, les analyses moléculaires ont témoigné de la sélection de populations étroitement liées à la présence des racines. Cela s'accompagne, avec le développement du végétal, d'une augmentation sensible des teneurs en nitrites associée à une diminution importante des nitrates, indiquant une dynamisation du cycle de l'azote dans les sols. Les teneurs en phosphate et en potassium en revanche fluctuent très peu quelque soit le type de sol. L'augmentation sensible mais significative pour le phosphate soluble dans les cendres est également à mettre en relation avec les processus d'exsudation racinaire, favorisant la solubilisation et l'absorption du nutriment par la plante (Bertin et al., 2003; Dakora & Phillips, 2002). Associé aux apports en carbone*

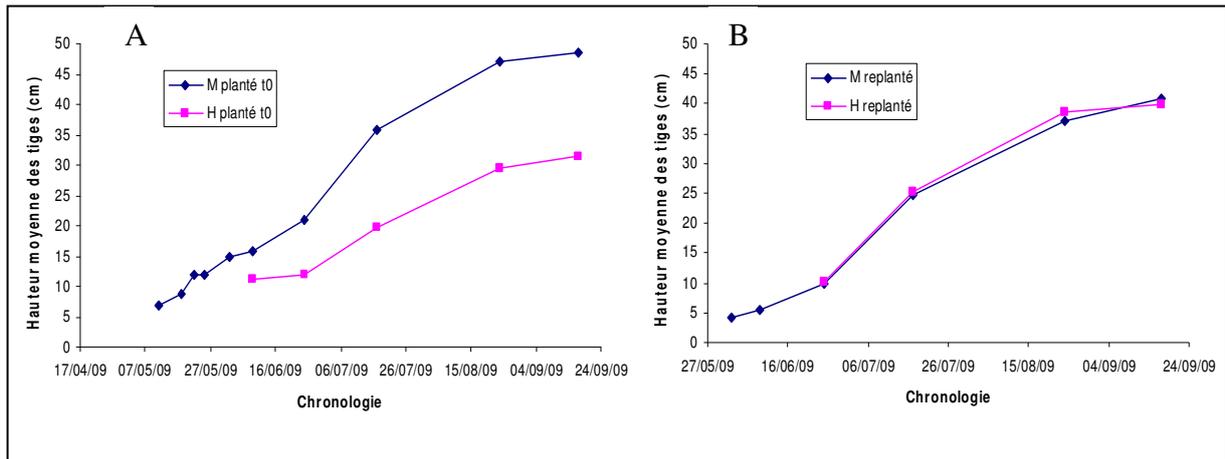
*organique directement utilisable par la microflore rhizosphérique, ces processus suggèrent à terme un « vieillissement » accentué de ce matériau en couvert végétal. En outre, la culture de MxG ne modifie pas la qualité des lixiviats des sols de friche (pollués et non pollués), ce qui limiterait les risques environnementaux liés à la dégradation et à la remobilisation potentielle de certains contaminants.*

### **III.3. ESSAIS EN CHAMPS**

Suite aux essais en microcosme, témoignant de l'adaptation de MxG aux différents substrats étudiés (à faible valeur agronomique), les possibilités de cultures *in situ* ont été évaluées au niveau de micro-parcelles, délimitées sur les sites industriels dont sont issus les sols (ancienne cokerie et parc à cendres d'usine thermique). Ces essais ont été menés durant deux saisons printanières comprenant les premiers stades de germination des rhizomes et de croissance des tiges. Ces périodes de culture de l'ordre de 3 à 4 mois ne sont pas suffisantes pour indiquer une dissipation significative des polluants (évaluée durant les tests en microcosmes), phénomène d'autant plus difficile à mesurer de part l'hétérogénéité spatiale de la contamination *in situ* (Fouquet, 2006). De plus, concernant l'impact sur les nutriments du sol, des analyses réalisées un an après la plantation de MxG sur une ancienne station de lavage du charbon (Forbach, Moselle Est) ont également confirmé la nécessité d'allonger la période de culture permettant l'observation de variations entre zones plantées et non plantées (annexe 8). Aussi, seuls seront présentés les résultats liés à la croissance des plantes dans les sites de friche.

#### ***III.3.1. Sols de friche pollués***

Une plantation sur site a été lancée à la fin de l'automne 2008, au niveau des deux parcelles choisies pour leur contamination majeure en HAP d'une part, et pour leur contamination « mixte » HAP-métaux d'autre part, les teneurs en HAP étant moins importantes à cette parcelle (parcelles desquelles sont issus les échantillons de sol H2 et M2 respectivement).



**Figure 69 : Croissance de MxG en micro-parcelles sur sols de friche contaminés, où ont été prélevés les échantillons de sols H2 (parcelle H) et M2 (parcelle M). A : rhizomes plantés en automne 2008, B : rhizomes replantés au printemps 2009.**

Pour les rhizomes mis en terre en automne 2008, on note une croissance en moyenne moins importante au niveau de la parcelle « HAP », bien qu'il n'y ait pas de différence significative avec la croissance en parcelle « mixte » (Figure 69, A). En revanche, pour les rhizomes replantés au printemps de l'année suivante, on observe une croissance similaire au niveau des tiges quelques soient les parcelles, de l'ordre de 45 cm de hauteur au dernier entre-nœud (Figure 69, B). Les différences de croissance observées pour les rhizomes mis en terre à l'automne 2008 entre chacune des deux parcelles sont vraisemblablement dues aux conditions environnementales ayant impacté ces rhizomes.



**Figure 70 : Aspect des plants de MxG au niveau des sols de friche : sur parcelle H (à gauche) et sur parcelle M (à droite).**

L'aspect des plantes montre en effet que les conditions environnementales sont plus drastiques au niveau de la parcelle H, avec une exposition totale au soleil et au vent (Figure 70). La densité des tiges/m<sup>2</sup> varie toutefois en fonction du type de parcelle : 3,06 pousses en moyenne pour la parcelle M contre 1,8 pour la parcelle H. Il apparaît par conséquent intéressant d'inclure ce paramètre comme critère de suivi de culture aux prochaines saisons de repousse. Cependant, aucune différence significative de la hauteur des plantes n'a été mesurée, soulignant les capacités d'adaptation du végétal.

### **III.3.2. Parc à cendres**

Une culture sur le parc à cendres avait également été lancée dès la première année d'étude sur le site. Différentes pratiques de récoltes (fauchage et/ou collecte des parties aériennes/laissées sur pieds) avaient été définies pour chacune des parcelles plantées. Les essais avaient été conduits en triplicats pour chaque modalité, répartis en 9 parcelles plantées et 3 parcelles témoins (laissées en l'état). Un total de 185 rhizomes de MxG avait été mis en terre (21 mai 2008). Une première série d'observation menée 28 jours après la mise en terre avait témoigné :

- d'un pourcentage de levée sur l'ensemble des parcelles de 47%
- d'une taille moyenne des plants au premier entrenœud de l'ordre de 7cm (+/- 4cm), (Figure 71, a et b).



a)



b)

**Figure 46 : a et b : plants émergés en champ au bout de 28 jours.**

Une deuxième série d'observation, après 60 jours de culture en champ avait permis de constater :

- l'émergence de nouveaux plants, amenant le pourcentage de levée sur l'ensemble des parcelles à 54%
- des rhizomes déterrés/des feuilles et des tiges consommés par les ravageurs (Figure 72).



**Figure 72 : a et b : tiges et feuilles broutées sur des plants âgés de 60 jours**

Suite à ces observations, une clôture électrifiée fût installée autour des parcelles dès la semaine suivante pour protéger les parcelles (18 juillet 2008). De nouvelles observations, réalisées le 1<sup>er</sup> septembre, ont confirmé la reprise de croissance de la moitié des plants broutés (Figure 73 et Figure 74, a et b respectivement).



**Figure 73 : a et b : reprise de croissance de plants broutés suite à la pose d'une clôture électrifiée, croissance sur un mois.**



a)

b)

**Figure 74 : a : Plant initialement protégé du broutage, croissance attendue, b : Rhizome du lot initialement mis en terre, qui s'était maintenu en dormance, nouvellement germé depuis la visite du 18 juillet (1 mois et demi de croissance).**

Finally, the replacement of the totality of damaged rhizomes was carried out on 5 and 25 September 2008. A visit during the second campaign of re-planting on 25 September allowed to observe that two thirds of the rhizomes replaced on 5 of this month had already started to germinate during the 3 weeks separating the two plantings. A last visit on 30 October 2008 allowed to observe the viability of 41% of the total rhizomes planted (77 on 185) (Figure 75, a and b).



a)



b)

**Figure 75 : a, b : état des rhizomes remplacés, dernière observation le 30 octobre 2008.**

One can observe however that the protection culture has been consumed and that the planting with electric fence has been browsed (Figure 76).



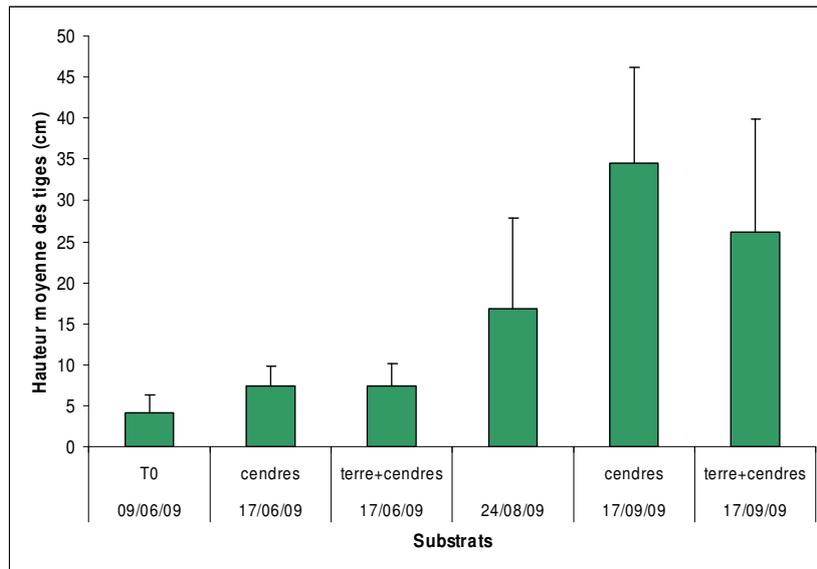
**Figure 76 : Plantation avec clôture électrifiée (à gauche) et mise en place d'une culture de protection (extension hors parcelle, à droite).**

Au niveau des parcelles grillagées en revanche, les plantes se sont correctement développées (Figure 77).



**Figure 77 : Parcelle entièrement grillagée et fermée.**

En effet, la croissance observée est comparable à celle de la première saison de culture, avec des hauteurs de tiges de 30 cm en moyenne au bout de 3,5 mois de croissance (Figure 78). Afin de vérifier l'influence potentielle d'une voie améliorative (I.2.4) dans la revégétalisation des cendres, une parcelle de 64 m<sup>2</sup> a également été recouverte d'une couche de terre de remblai mélangée aux cendres sur une épaisseur de 10 cm.



**Figure 78 : Croissance de MxG au niveau du parc a cendres après la pose de grillages fins (été-automne 2009).**

Aucune différence significative entre les parcelles amendées ou non en terre durant ces premières phases de croissance n'a finalement été observée sur cette première série de culture (Figure 78). En revanche, l'influence de cette voie améliorative pourrait être à nouveau évaluée aux prochaines saisons de repousse sur la protection des rhizomes (contre le froid et le gel) et sur leur germination subséquente.

*Ces essais en sols de friche ont souligné la nécessité de prise en compte des facteurs environnementaux dans la pérennité de l'établissement d'un couvert végétal in situ. En outre, la remarquable aptitude de MxG à s'adapter et à se développer dans des substrats variés, sans pratique agronomique particulière a pu être confirmée, témoignant de l'intérêt de l'utilisation de cette plante dans des processus de phytoremédiation à grande échelle.*

## **IV. CONCLUSION GENERALE ET** **PERSPECTIVES**

La compréhension des processus biogéochimiques liés à la phytoremédiation des sols pollués nécessite une approche multidisciplinaire basée à la fois sur des aspects analytiques (identification et suivi des contaminants, modification de la qualité des sols) et biologiques. Ce dernier point implique une connaissance approfondie tant au niveau du sol (identification et suivi des microorganismes d'intérêt, *i.e.* impliqués dans la bioremédiation) qu'au niveau de la plante (caractérisation des molécules exsudées au niveau rhizosphérique, adaptation et suivi de la croissance végétale).

L'isolement de souches bactériennes impliquées dans la biodégradation des HAP a été conduit à partir de souches conservées au laboratoire et d'un échantillon de sol issu de la friche industrielle à réhabiliter. Des enrichissements en milieu liquide en présence de pyrène et de divers co-métabolites ont été réalisés, permettant la sélection de huit cultures bactériennes mixtes, capables de se développer en présence de pyrène uniquement, de pyrène et de phénanthrène, de pyrène et d'acide salicylique ou de pyrène et de gazoil. L'identification des différentes populations bactériennes composant ces cultures a mis en évidence un nombre variable de souches en fonction des co-substrats en présence, soulignant l'importance du co-métabolisme et de la biodisponibilité des contaminants dans la dégradation des HAP. En effet, les souches les plus nombreuses sont issues des enrichissements avec pyrène supplémenté en acide salicylique ou en phénanthrène. Les souches les moins « performantes » en termes de croissance sur gélose minimum plus pyrène uniquement sont celles issues des cultures mixtes enrichies en gazoil (mélange d'hydrocarbures aliphatiques essentiellement).

L'étude *in vitro* de la biostimulation des différentes cultures mixtes a mis en évidence une croissance et une activité des bactéries biodégradantes accrue en présence des exsudats racinaires totaux de MxG. La relation spécifique entre capacité de dégradation des HAP et utilisation d'une fraction polycyclique des exsudats de MxG a ainsi pu être soulignée.

La mise en place d'une méthode de collecte et de production d'exsudats racinaires a permis la caractérisation des composés majeurs (17 acides aminés, 5 acides organiques, 4 sucres) potentiellement impliqués dans des interactions plantes-bactéries de type chimiotactisme et croissance bactérienne non spécifique au niveau rhizosphérique. L'identification de métabolites secondaires à structure polyphénolique a révélé la présence de molécules de type flavonoïdes représentés essentiellement par la quercétine, la rutine, l'apigénine, l'isovitexine, la catéchine et l'acide gallique. L'évaluation *in vitro* de la biostimulation bactérienne résultant de l'ajout de ces molécules aux milieux de culture a témoigné d'une croissance et d'une activité de dégradation variables fonction des composés, des conditions environnementales (conditions trophiques liées aux milieux de culture utilisés) ainsi que des cultures mixtes bactériennes considérées. Ainsi, en présence de HAP et en milieu riche (YEPG dilué au 1/10<sup>ème</sup>), il semblerait que la présence de quercétine favorise à la fois une croissance et une activité de dégradation accrue des bactéries à capacité de dégradation de molécules aromatiques telles que le pyrène et le phénanthrène. L'apigénine témoignerait en revanche d'un effet bactériostatique, alors qu'en milieu minimum la situation inverse serait observée. Aussi, la combinaison systématique de certaines molécules (quercétine, apigénine, catéchine et acide gallique) peut s'avérer sans effet apparent sur la croissance et l'activité bactérienne en fonction des doses utilisées. La biostimulation des bactéries dégradantes et l'enrichissement spécifique de certaines souches, bien qu'évidentes en présence d'exsudats totaux de MxG, repose sur des interactions complexes nécessitant des investigations complémentaires.

Afin d'appréhender l'impact de l'exsudation racinaire sur les communautés bactériennes *in vivo*, des essais en microcosme de sols artificiellement contaminés ou directement issus du site de friche industrielle ont été conduits. L'identification et le suivi des microorganismes rhizosphériques *in situ* nécessite le recours à des techniques de biologie moléculaire s'affranchissant des contraintes liées aux méthodes de cultures pasteuriennes. Une méthode d'extraction et de purification d'acides nucléiques applicable aux différents types de sols étudiés a dû être développée. Certaines hypothèses supplémentaires liées aux phénomènes conduisant à la précipitation sélective des contaminants des acides nucléiques (en particulier les acides humiques) ont pu être approfondies, permettant l'établissement d'un protocole de purification d'acides nucléiques de sol simple et rapide, avec des variations dans la méthode pour des contaminations importantes en acides humiques (100 mg/g sol sec). Cette méthode d'extraction-purification d'acides nucléiques associée aux applications en PCR-TTGE et de séquençages des bandes ont permis l'établissement des profils génétiques

des sols traités et leur suivi. L'effet rhizosphérique de *Miscanthus x giganteus* sur l'évolution des communautés bactériennes a indiqué la sélection au niveau racinaire (rhizoplan) de phylotypes spécifiques, potentiellement liées aux processus de bioremédiation, dans l'ensemble des sols étudiés. En effet, le dosage des HAP restants après culture suggère que l'établissement de la rhizosphère de MxG favorise dans un premier temps la remobilisation d'une partie des contaminants, puis leur dissipation progressive (en particulier pour les HAP à quatre cycles aromatiques). La technique de phytoremédiation par rhizodégradation des polluants organiques, processus long nécessitant plusieurs mois voire années, apparaît ainsi comme un procédé particulièrement intéressant pour améliorer la dissipation des contaminants organiques persistants.

Le second volet de réhabilitation des sols dégradés abordé au cours de ce travail concerne la revégétalisation des cendres volantes. Les facteurs limitant cette méthode de phytostabilisation du matériau, soulignés dans l'étude bibliographique (pH élevé, carences en nutriments, propriétés pouzzolaniques...), prédéterminent le choix des espèces végétales à planter sur ce type de substrat. Les caractéristiques physico-chimiques des cendres étudiées l'apparentent à un sol sablo-limoneux, à pH basique, non pollué, d'une teneur en matière organique moyenne de 3,31%, et un rapport C/N élevé suggérant une activité microbienne favorable à la minéralisation. De manière globale, les concentrations en cations malgré une carence en potassium restent compatibles avec l'installation et le développement de MxG. Des valeurs similaires ont en effet été mesurées sur une ancienne station de lavage de charbon (Forbach, Moselle est) sur laquelle une culture de MxG fut lancée avec succès par le laboratoire en 2006 (annexe 8).

La croissance des plants de MxG sur les différents substrats a finalement témoigné d'une capacité d'adaptation remarquable face aux différentes conditions de contamination des sols (friche contaminée) et de disponibilité en nutriments (cendres volantes). Le ralentissement de la croissance aérienne lorsqu'il est observé demeure toutefois associé à un développement des parties souterraines (racines et rhizomes) équivalent à celui obtenu dans un sol de « référence », laissant présager de capacités d'installation de la plante et de remédiation conséquentes à long terme en situation de sols de friche. Ainsi, une période de culture de 4,5 mois en microcosmes de laboratoire a permis de mettre en évidence une augmentation significative des teneurs en carbone organique dissous dans les cendres plantées.

Des plantations *in situ* ont également été lancées en parallèle à la fois sur sol de friche contaminés et dans le parc à cendres. L'analyse des résultats de croissance a souligné la nécessité de la prise en compte de facteurs environnementaux supplémentaire en champs (prédation, expositions aux différents facteurs climatiques). Au niveau des sols de friche contaminés, les variations environnementales résultent en une croissance différentielle durant les premières phases d'implantation de la culture, et une émergence variable du nombre de tige/m<sup>2</sup>. Cependant, la taille des plantes à la saison de culture suivante demeure équivalente. Au niveau des cendres, plus de la moitié des rhizomes initialement mis en terre (54 %) finissent par germer. La croissance des plantes se maintient tout au long de la saison de culture, atteignant environ 30 cm en 3,5 mois mais ne témoignant pas de différence entre des parcelles préalablement amendées en terre de surface. En définitive, la phytoremédiation de sols pollués par des HAP grâce à la culture de *Miscanthus x giganteus* dans un contexte plus général de revégétalisation de sols dégradés constituent une approche prometteuse de revalorisation de des substrats à faible potentiel agronomique et de réhabilitation à long terme des sites de friche concernés (Figure 79).

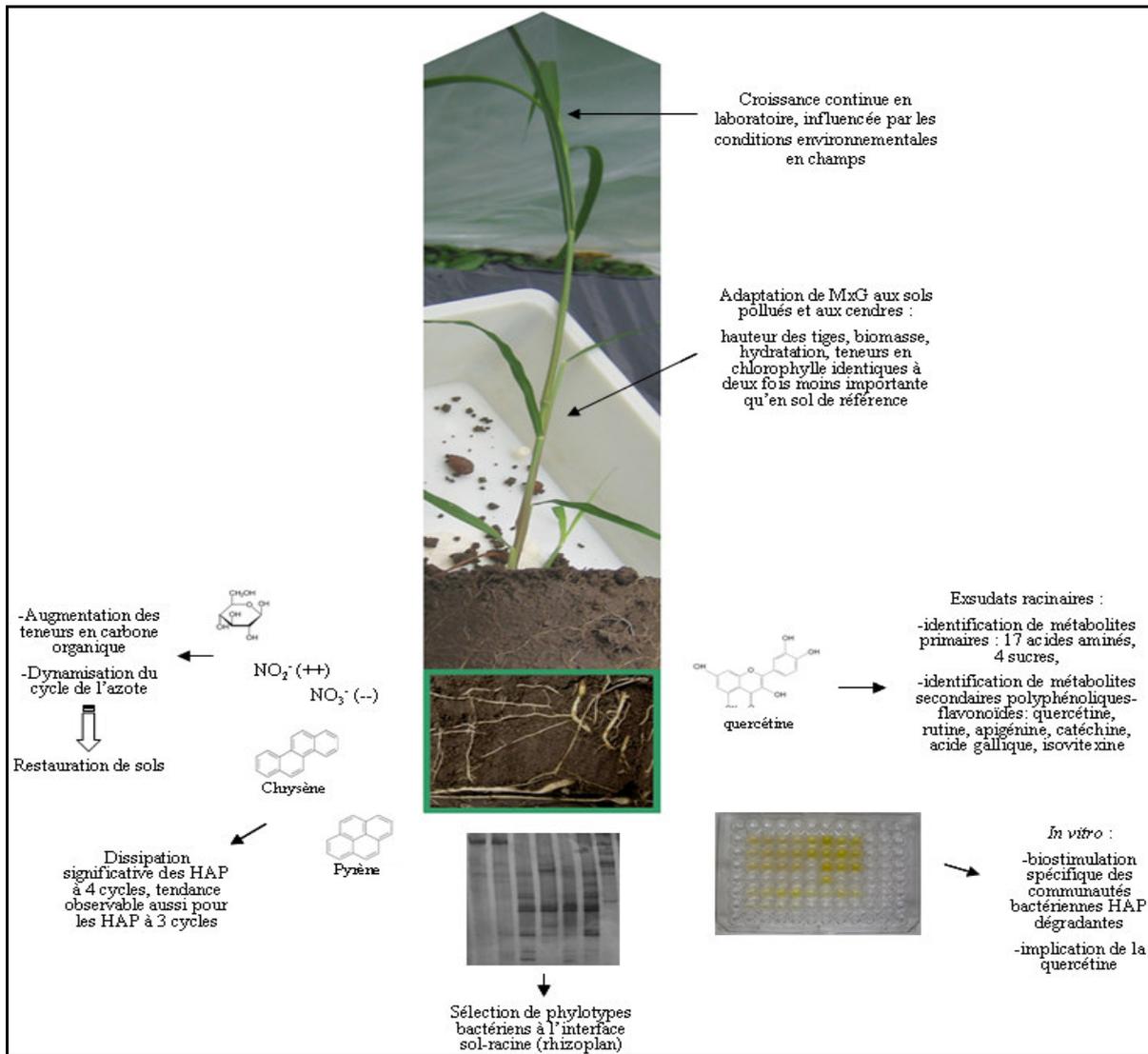


Figure 79 : Interactions entre *Miscanthus x giganteus*, bactéries rhizosphériques, HAP et sols.

Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour mieux appréhender les différentes interactions plantes-microorganismes mises en évidence. Concernant la phytoremédiation des sols contaminés en HAP, les effets des exsudats totaux et des différentes classes de métabolites secondaires pourraient être confirmés par les dosages de fraction de HAP résiduelles après cultures bactériennes, avec par exemple l'adaptation de méthodes de dosages fluorimétriques en microplaque pour garder les avantages de ce format de travail. La quantification de l'expression de gènes de biodégradation des HAP (catéchol dioxygénases) par PCR quantitative (ou biopuces) constituerait une confirmation supplémentaire dans l'induction de voies cataboliques et une meilleure intégration au niveau des phénomènes de régulation globale du métabolisme en présence de sources de carbone facilement assimilables d'une part (exsudats racinaires) et de contaminants hydrophobes récalcitrants d'autre part (HAP). L'identification en parallèle des métabolites de dégradation,

à la fois des HAP, et des métabolites secondaires racinaires testés pourraient également éclairer sur les mécanismes enzymatiques mis en jeu.

L'étude de l'expression génique pourrait aussi être menée directement au niveau des sols (microcosmes et *in situ*). A ce sujet, l'adaptation du protocole de purification d'acides nucléiques à l'isolement d'ARN messagers couplée par la suite à la quantification des gènes de dégradation et/ou d'identification bactérienne (ARNr 16S) permettrait également de mieux comprendre l'évolution des interactions plantes-bactéries durant les processus de rhizoremédiation. La prévalence et l'expression génique d'autres gènes que ceux liés à la biodégradation des HAP, comme ceux impliqués dans les cycles biogéochimiques (notamment celui de l'azote) pourraient également apporter des informations supplémentaires concernant les capacités d'adaptation de MxG aux sols pauvres.

L'étude des microorganismes impliqués dans la bioremédiation pourrait s'étendre aux bactéries constituant la microflore endophyte des racines de MxG. De par l'adaptation de la plante à une grande variété de sols aux caractéristiques physico-chimiques variés, il ne fait aucun doute que la mycorrhization tient aussi une place prépondérante dans la résistance de la plante aux contraintes environnementales. Certains métabolites secondaires identifiés sont en outre connus pour leur rôle dans l'établissement de relations symbiotiques plantes-champignons (rutine). Dans la mesure où les essais de culture de MxG en présence de métaux (rapportés dans la littérature; Fernando et al., 2004) n'ont pas fait état de translocation ni d'accumulation significative des éléments traces dans les parties aériennes, et très peu dans les parties souterraines, les symbioses mycorrhiziennes jouent probablement là aussi un rôle prépondérant dans la séquestration/accumulation ou immobilisation de métaux dans la mycorrhizosphère. Il conviendrait ainsi d'étudier la phytoremédiation des autres polluants (organiques et minéraux) présents dans les sols de friche et leur dissipation découlant des associations bactéries-plantes- mycorrhizes.

La confrontation des résultats en microcosmes avec les données recueillies progressivement en champs offrirait une meilleure compréhension des processus de restauration de sol mis en jeu. A long terme, la vérification de l'effet de l'amendement en terre sur la reprise des rhizomes, la production de biomasse et l'effet préventif contre l'érosion éolienne pourront également être évalués au niveau du parc à cendres. Les effets d'un couplage amendements en cendres non polluées-remédiation de sols contaminés à texture sableuse et à carences en nutriments pourrait également être évaluée, de même que

l'établissement de culture en technosols. Sur l'ensemble des substrats à réhabiliter, la pérennisation des cultures de *Miscanthus x giganteus* dépendra de la stabilité des caractères non invasifs de la plante et de sa résistance aux pathogènes, également modulée par la qualité des sols.

Enfin, si la production d'une biomasse de qualité se confirme sur les différents substrats étudiés, la culture de MxG pourra conduire à l'élaboration de micro-filières s'inscrivant ainsi directement dans des politiques de développement durable.

# V. REFERENCES

## A

- Abd-El salam, H., Hafez, E. & Zaki, E. (2006). Naphthalene and phenol degradation by *Flavobacterium* sp. DQ398100 and *Pseudomonas putida* DQ399838 isolated from petroleum polluted soil. *Chinese Journal of Geochemistry*, **25**(0), 83-84.
- Adriano, D. C., Page, A. L., Elseewi, A. A., Chang, A. C. & Straughan, I. (1980). Utilization and disposal of fly ash and other coal residues in terrestrial ecosystems: a review. *Journal of Environmental Quality*, **9**(3), 333-344.
- Ae, N., Arihara, J., Okada, K., Yoshihara, T. & Johansen, C. (1990). Phosphorus Uptake by *Pigeon Pea* and Its Role in Cropping Systems of the Indian Subcontinent. *Science*, **248**(4954), 477-480.
- Afechkar, M. & Nahhass, M. (2005). Valorisation des cendres volantes dans le domaine routier (Terrassements et couches de chaussées). *Documentation routière – Actes du 7ème congrès de la route – Techniques innovantes*.
- Ainsworth, E. A., Rosenberg, M. S. & Wang, X. (2007). Meta-analysis: the past, present and future. *New Phytologist*, **176**(4), 742-745.
- Aitken, R. L., Campbell, D. J. & Bell, L. C. (1984). Properties of Australian Fly Ashes Relevant to Their Agronomic Utilization. *Australian Journal of Soil Research*, **22**(4), 443-453.
- Akroum, S., Bendjeddou, D., Satta, D. & Lalaoui, K. (2010). Antibacterial, antioxidant and acute toxicity tests on flavonoids extracted from some medicinal plants. *International Journal of Green Pharmacy*, **4**(3), 165-169.
- Alexander, M. (2000). Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. *Environmental Science & Technology*, **34**(20), 4259-4265.
- Alkorta, I. & Garbisu, C. (2001). Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology*, **79**(3), 273-276.
- Allard, A.-S., Remberger, M. & Neilson, A. H. (2000). The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **46**(1), 43-49.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**(1), 143-169.
- Amellal, N., Portal, J. M. & Berthelin, J. (2001). Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. *Applied Geochemistry*, **16**(14), 1611-1619.
- Amiot, J. (2004). Utilisation d'espaces dégradés en vue de production de biomasse. Etat des connaissances et perspectives. *Mémoire de Maîtrise de Biologie des Populations et Ecosystèmes, ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie)*.
- Anderson, T. A., Guthrie, E. A. & Walton, B. T. (1993). Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental Science & Technology*, **27**(13), 2630-2636.
- 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**(5), 401-412.
- Aprill, W. & Sims, R. C. (1990). Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere*, **20**(1-2), 253-265.
- Arduini, I., Ercoli, L., Mariotti, M. & Masoni, A. (2006). Response of miscanthus to toxic cadmium applications during the period of maximum growth. *Environmental and Experimental Botany*, **55**(1-2), 29-40.
- Arduini, I., Masoni, A. & Ercoli, L. (2006). Effects of high chromium applications on miscanthus during the period of maximum growth. *Environmental and Experimental Botany*, **58**(1-3), 234-243.
- Arduini, I., Masoni, A., Mariotti, M. & Ercoli, L. (2004). Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation. *Environmental and Experimental Botany*, **52**(2), 89-100.
- Arnebrant, K., Baath, E., Nordgren & A. (1987). Copper tolerance of microfungi isolated from polluted and unpolluted forest soil. Mycological Society of America, Lawrence, KS, ETATS-UNIS.
- Arshad, M., Saleem, M. & Hussain, S. (2007). Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in Biotechnology*, **25**(8), 356-362.

- Ashford, A. E., Peterson, C. A., Carpenter, J. L., Cairney, J. W. G. & Allaway, W. G. (1988). Structure and permeability of the fungal sheath in the *Pisonia* mycorrhiza. *Protoplasma*, **147**(2), 149-161.
- Averett, J. E., Banks, W. A. & Boehme, D. E. (1978). Negative allelopathic effects of rutin and quercetin on fourteen soil and enteric microbes. *Biochemical Systematics and Ecology*, **6**(1), 1-3.
- Azuma, H., Toyota, M., Asakawa, Y. & Kawano, S. (1996). Naphthalene-a constituent of *Magnolia* flowers. *Phytochemistry*, **42**(4), 999-1004.

## B

- Baba, A. (2002). Assessment of radioactive contaminants in by-products from Yatagan (Mugla, Turkey) coal-fired power plant. *Environmental Geology*, **41**(8), 916-921.
- Babu, T. S., Marder, J. B., Tripuranthakam, S., Dixon, D. G. & Greenberg, B. M. (2001). Synergistic effects of a photooxidized polycyclic aromatic hydrocarbon and copper on photosynthesis and plant growth: Evidence that *in vivo* formation of reactive oxygen species is a mechanism of copper toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**(6), 1351-1358.
- Bach, H. J., Tomanova, J., Schloter, M. & Munch, J. C. (2002). Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *Journal of Microbiological Methods*, **49**(3), 235-245.
- Badri, D. V., Weir, T. L., van der Lelie, D. & Vivanco, J. M. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, **20**(6), 642-650.
- Baird, W. M., Hooven, L. A. & Mahadevan, B. (2005). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **45**(2-3), 106-114.
- Bais, H. P., Park, S.-W., Weir, T. L., Callaway, R. M. & Vivanco, J. M. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in plant science*, **9**(1), 26-32.
- Balkwill, D. L., Fredrickson, J. K. & Romine, M. F. (2006). *Sphingomonas* and Related Genera. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, M. Dworkin et al., eds., Springer New York, 605-629.
- Bamforth, S. M. & Singleton, I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **80**(7), 723-736.
- Barber, D. A. & Lynch, J. M. (1977). Microbial growth in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, **9**(5), 305-308.
- Barkay, T., Navon-Venezia, S., Ron, E. Z. & Rosenberg, E. (1999). Enhancement of Solubilization and Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons by the Bioemulsifier Alasan. *Applied Environmental Microbiology*, **65**(6), 2697-2702.
- Barlaan, E. A., Sugimori, M., Furukawa, S. & Takeuchi, K. (2005). Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods*, **61**(3), 399-412.
- Barraquio, W. L., Dumont, A. & Knowles, R. (1988). Enumeration of Free-Living Aerobic N<sub>2</sub>-Fixing H<sub>2</sub>-Oxidizing Bacteria by Using a Heterotrophic Semisolid Medium and Most-Probable-Number Technique. *Applied Environmental Microbiology*, **54**(6), 1313-1317.
- Barthet, L., Durrieu, C., Ka Bouchi, S. & Perrodin, Y. (2003). Contribution à l'évaluation de l'impact sur les écosystèmes aquatiques de la valorisation en BTP de mâchefers d'incinération d'ordures ménagères (MIOM). Société alpine de publications, Grenoble, FRANCE.
- BASOL. (2008). Base de données sur les sites et sols pollués (ou potentiellement pollués), fiche descriptive du site "Centrale EDF de Production Thermique Richemont, département 57, site 151"; [http://basol.environnement.gouv.fr/fiche.php?page=1&index\\_sp=57.0151](http://basol.environnement.gouv.fr/fiche.php?page=1&index_sp=57.0151), Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement durable et du Territoire, mis à jour 01/09/2008.
- BASOL. (2008). Base de données sur les sites et sols pollués (ou potentiellement pollués), [http://basol.environnement.gouv.fr/fiche.php?page=1&index\\_sp=57.0151](http://basol.environnement.gouv.fr/fiche.php?page=1&index_sp=57.0151), Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement durable et du Territoire, mis à jour 01/09/2008.
- Basta, T., Buerger, S. & Stolz, A. (2005). Structural and replicative diversity of large plasmids from sphingomonads that degrade polycyclic aromatic compounds and xenobiotics. *Microbiology*, **151**(6), 2025-2035.
- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., de Wachter, R., Verachtert, H. & Diels, L. (2000). Isolation of Adherent Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Degrading Bacteria Using PAH-Sorbing Carriers. *Applied Environmental Microbiology*, **66**(5), 1834-1843.
- Bate-Smith, E. C. (1962). The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance: Dicotyledons. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, **58**(371), 95-173.
- Baud-Grasset, F., Baud-Grasset, S. & Safferman, S. I. (1993). Evaluation of the bioremediation of a contaminated soil with phytotoxicity tests. *Chemosphere*, **26**(7), 1365-1374.

- Beale, C. V., Morison, J. I. L., Long & S. P. (1999). Water use efficiency of C<sub>4</sub> perennial grasses in a temperate climate. *Agriculture and Forest Meteorology*, **96**(1-3), 103-115.
- Beale, C. V. & Long, S. P. (1997). Seasonal dynamics of nutrient accumulation and partitioning in the perennial C<sub>4</sub>-grasses *Miscanthus × giganteus* and *Spartina cynosuroides*. *Biomass and Bioenergy*, **12**(6), 419-428.
- Belz, R. G. & Hurle, K. (2004). Differential Exudation of Two Benzoxazinoids One of the Determining Factors for Seedling Allelopathy of *Triticeae* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(2), 250-261.
- Ben-Dov, E., Kramarsky-Winter, E. & Kushmaro, A. (2009). An *in situ* method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique. *FEMS Microbiology Ecology*, **68**(3), 363-371.
- Benezet, J.-C., Adamiec, P. & Benhassaine, A. (2008). Relation between silico-aluminous fly ash and its coal of origin. *Particuology*, **6**(2), 85-92.
- Bengtsson, G., Törneman, N. & Yang, X. Spatial uncoupling of biodegradation, soil respiration, and PAH concentration in a creosote contaminated soil. *Environmental Pollution*, **158**(9), 2865-2871.
- Bennett, G. F. (1995). *In situ* bioremediation: When does it work? : Committee on *In Situ* Bioremediation, Water Science and Technology Board, Commission on Engineering and Technical Systems, National Research Council, National Academy Press, Washington, DC, 1993, 207 pages, ISBN 0-309-04896-6. *Journal of Hazardous Materials*, **42**(1), 109-110.
- Berg, G. & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, **68**(1), 1-13.
- Berset, J. D., Ejem, M., Holzer, R. & Lischer, P. (1999). Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. *Analytica Chimica Acta*, **383**(3), 263-275.
- Bertin, C., Yang, X. & Weston, L. A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, **256**(1), 67-83.
- Beuch, S, Boelcke, B, Belau & L. (2000). Effect of the organic residues of *Miscanthus x Giganteus* on the soil organic matter level of Arable soils. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **184**(2), 111-119.
- Bhandari, S. R., Kapadi, A. H., Mujumder, P. L., Joardar, M. & Shoolery, J. N. (1985). Nudol, a phenanthrene of the orchids *Eulophia nuda*, *Eria carinata* and *Eria stricta*. *Phytochemistry*, **24**(4), 801-804.
- Binet, P., Portal, J. M. & Leyval, C. (2000). Dissipation of 3-6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**(14), 2011-2017.
- Bispo, A., Jourdain, M. J. & Jauzein, M. (1999). Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Organic Geochemistry*, **30**(8, Part 2), 947-952.
- Björseth, A., Lunde, G. & Lindskog, A. (1979). Long-range transport of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Atmospheric Environment* (1967), **13**(1), 45-53.
- Blumer, M. (1961). Benzpyrenes in Soil. *Science*, **134**(3477), 474-475.
- Blumer, M. (1976). Polycyclic aromatic compounds in nature. *Scientific America*, **234**(3), 35-45.
- Blumer, M. & Youngblood, W. W. (1975). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils and Recent Sediments. *Science*, **188**(4183), 53-55.
- Boeuf-Tremblay, V., Plantureux, S. & Guckert, A. (1995). Influence of mechanical impedance on root exudation of maize seedlings at two development stages. *Plant and Soil*, **172**(2), 279-287.
- Bogan, B. W., Lahner, L. M., Sullivan, W. R. & Paterek, J. R. (2003). Degradation of straight-chain aliphatic and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a strain of *Mycobacterium austroafricanum*. *Journal of Applied Microbiology*, **94**(2), 230-9.
- Bogan, B. W. & Sullivan, W. R. (2003). Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere*, **52**(10), 1717-1726.
- Bogardt, A. H. & Hemmingsen, B. B. (1992). Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlay technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites. *Applied Environmental Microbiology*, **58**(8), 2579-2582.
- Bogdanovic, I., Fazinic, S., Itskos, S., Jaksic, M., Karydas, E., Katselis, V., Paradellis, T., Tadic, T., Valkovic, O. & Valkovic, V. (1995). Trace element characterization of coal fly ash particles. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **99**(1-4), 402-405.
- Bojes, H. K. & Pope, P. G. (2007). Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **47**(3), 288-295.
- Boldrin, B., Tiehm, A. & Fritzsche, C. (1993). Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Applied Environmental Microbiology*, **59**(6), 1927-1930.

- Bond, B. C., Virley, D. J., Cairns, N. J., Hunter, A. J., Moore, G. B. T., Moss, S. J., Mudge, A. W., Walsh, F. S., Jazin, E. & Preece, P. (2002). The quantification of gene expression in an animal model of brain ischaemia using TaqMan(TM) real-time RT-PCR. *Molecular Brain Research*, **106**(1-2), 101-116.
- Boonchan, S., Britz, M. L. & Stanley, G. A. (2000). Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures. *Applied Environmental Microbiology*, **66**(3), 1007-1019.
- Boonchan, S., Britz, M. L. & Stanley, G. A. (1998). Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnology and Bioengineering*, **59**(4), 482-494.
- Booth, A. A., Khalifah, R. G. & Hudson, B. G. (1996). Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end-products: comparison with aminoguanidine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **220**(1), 113-9.
- Bossert, I. D. & Bartha, R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. *Petroleum Microbiology*, pp. 435-473.
- Bossert, I. D. & Bartha, R. (1986). Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **37**(1), 490-495.
- Botta, C., Di, G., Carole, Sabatier, A.-S. & De Méo, M. (2009). Effects of UVA and visible light on the photogenotoxicity of benzo[a]pyrene and pyrene. *Environmental Toxicology*, **24**(5), 492-505.
- Bouchard, J. (1999). Effets produits chez trois espèces de criquets par l'ingestion d'hydrocarbures polycycliques réputés cancérigènes. *Annales des Sciences Naturelles - Zoologie et Biologie Animale*, **20**(2), 53-66.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Vandecasteele & J, P. (1997). An interfacial uptake mechanism for the degradation of pyrene by a *Rhodococcus* strain, *Microbiology*, **143**(4), 1087-1093.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Bardin, V., Haeseler, F. & Vandecasteele, J.-P. (1999). Efficiency of defined strains and of soil cultures mixtes in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures. *Biodegradation*, **10**(6), 429-435.
- Bouchez, M., Blanchet, D. & Vandecasteele, J. P. (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43**(1), 156-164.
- Bourrelrier, P. H. & Berthelin, J. (1998). Contamination des sols par les éléments en trace : les risques et leur gestion. *Paris: Tec&Doc Lavoisier*, **42**, 440p.
- Bradshaw, A. (1997). Restoration of mined lands using natural processes. *Ecological Engineering*, **8**(4), 255-269.
- Brezna, B., Kweon, O., Stingley, R. L., Freeman, J. P., Khan, A. A., Polek, B., Jones, R. C. & Cerniglia C. E. (2006). Molecular characterization of cytochrome P450 genes in the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied microbiology and biotechnology*, **71**(4), 522-532.
- BRGM-INRA, Darmendrail D., BaizeD., Barbier J., Freyssinet P., Mouvet C., Salpéteur I. & Wavrer, P. (2000). Fond géochimique naturel - État des connaissances à l'échelle nationale. *Étude réalisée dans le cadre des actions de Service public du BRGM 99-F-269, BRGM/RP-50158-FR*.
- BRGM, MATE. (2000). Classeur Gestion des sites potentiellement pollués. Les guides relatifs au diagnostic approfondi et à l'évaluation détaillée des risques. *Editions du BRGM*.
- Brinch, U. C., Ekelund, F. & Jacobsen, C. S. (2002). Method for Spiking Soil Samples with Organic Compounds. *Applied Environmental Microbiology*, **68**(4), 1808-1816.
- Briones, A. M., Okabe, S., Umemiya, Y., Ramsing, N.-B., Reichardt, W. & Okuyama, H. (2003). Ammonia-oxidizing bacteria on root biofilms and their possible contribution to N use efficiency of different rice cultivars. *Plant and Soil*, **250**(2), 335-348.
- Brooijmans, R. J. W., Pastink, M. I. & Siezen, R. J. (2009). Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. *Microbial Biotechnology*, **2**(6), 587-594.
- Brown, D. G., Gupta, L., Kim, T.-H., Keith Moo-Young, H. & Coleman, A. J. (2006). Comparative assessment of coal tars obtained from 10 former manufactured gas plant sites in the Eastern United States. *Chemosphere*, **65**(9), 1562-1569.
- Bruns, A., Hoffelner, H. & Overmann, J. (2003). A novel approach for high throughput cultivation assays and the isolation of planktonic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **45**(2), 161-171.
- Brzostowicz, P. C., Reams, A. B., Clark, T. J. & Neidle, E. L. (2003). Transcriptional Cross-Regulation of the Catechol and Protocatechuate Branches of the {beta}-Ketoacid Pathway Contributes to Carbon Source-Dependent Expression of the *Acinetobacter* sp. Strain ADP1 pobA Gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**(3), 1598-1606.
- Bu, Q., Zhang, Z., Lu, S. & He, F. (2009). Vertical distribution and environmental significance of PAHs in soil profiles in Beijing, China. *Environmental Geochemistry and Health*, **31**(1), 119-131.

- Bullard, M. J., Christian, D. G. & Wilkins, C. (1996). The potential of graminaceous biomass crops for energy production in the UK: an overview. *Biomass for Energy and the Environment, Proceedings 9th EU Bioenergy Conference, Copenhagen, Denmark.*, Pergamon/Elsevier Publishers, 592-597.
- Burgess, R. M., Ahrens, M. J. & Hickey, C. W. (2003). Geochemistry of PAHs in Aquatic Environments: Source, Persistence and Distribution. John Wiley & Sons, Ltd.
- Burgmann, H., Pesaro, M., Widmer, F. & Zeyer, J. (2001). A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. *Journal of Microbiological Methods*, **45**(1), 7-20.
- Bushnell, L. D. & Haas, H. F. (1941). Utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, **41**, 653-673.

## C

- Cai, P., Huang, Q., Zhang, X. & Chen, H. (2006). Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**(3), 471-476.
- Cajthaml, T., Erbanová, P., Sasek, V. & Moeder, M. (2006). Breakdown products on metabolic pathway of degradation of benz[a]anthracene by a ligninolytic fungus. *Chemosphere*, **64**(4), 560-564.
- Cakmak, I., Marschner, H. (1988). Increase in membrane permeability and exudation in roots of zinc deficient plants. *Journal of Plant Physiology*, **132**, 356-361.
- Cakmak, I., Erenoglu, B., Gülüt, K. Y., Dericci, R. & Römheld, V. (1998). Light-mediated release of phytosiderophores in wheat and barley under iron or zinc deficiency. *Plant and Soil*, **202**(2), 309-315.
- Calabrese, E. J. & Blain, R. (2005). The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **202**(3), 289-301.
- Calabrese, E. J. & Blain, R. B. (2009). Hormesis and plant biology. *Environmental Pollution*, **157**(1), 42-48.
- Carlson, C. L. & Adriano, D. C. (1993). Environmental impacts of coal combustion residues. *Journal of Environmental Quality*, **22**, 227-247.
- Carlson, C. L. & Adriano, D. C. (1991). Growth and elemental content of two tree species growing on abandoned coal fly ash basins. *Journal of Environmental Quality*, **20**(3), 581-587.
- Carmichael, L. M. & Pfaender, F. K. (1997). Polynuclear aromatic hydrocarbon metabolism in soils: Relationship to soil characteristics and preexposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**(4), 666-675.
- Carmona, M., Rodriguez, M. J., Martinez-Costa, O. & de Lorenzo, V. (2000). *In Vivo* and *In Vitro* Effects of (p)ppGpp on the sigma 54 Promoter Pu of the TOL Plasmid of *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, **182**(17), 4711-4718.
- Cases, I. & de Lorenzo, V. (2005). Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nature Reviews Microbiology*, **3**(2), 105-118.
- Cases, I., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1999). The IIANtr (PtsN) Protein of *Pseudomonas putida* mediates the C Source Inhibition of the  $\sigma_{54}$ -dependent Pu Promoter of the TOL Plasmid. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(22), 15562-15568.
- Cavalieri, E. L. & Rogan, E. G. (1992). The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacology & therapeutics*, **55**(2), 183-199.
- Cavalieri, E. L. & Rogan, E. G. (1995). Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica*, **25**(7), 677-688.
- Cébron, A., Beguiristain, T., Faure, P., Norini, M. P., Masfaraud, J. F. & Leyval, C. (2009). Influence of vegetation on the in situ bacterial community and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degraders in aged PAH-contaminated or thermal-desorption-treated soil. *Applied Environmental Microbiology*, **75**(19), 6322-30.
- Cébron, A., Norini, M.-P., Beguiristain, T. & Leyval, C. (2008). Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD[alpha]) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, **73**(2), 148-159.
- Cereda, E., Braga Marcazzan, G. M., Pedretti, M., Grime, G. W. & Baldacci, A. (1995). Occurrence mode of major and trace elements in individual fly-ash particles. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **104**(1-4), 625-629.
- Cerniglia, C. E. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons : past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **19**(5-6), 324-333.
- Cerniglia, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, **3**(2), 351-368.
- Cerniglia, C. E. (1984). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in Applied Microbiology*, **30**, 31-71.

- Cerniglia, C. E., White, G. L. & Heflich, R. H. (1985). Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Archives of Microbiology*, **143**(2), 105-110.
- Chaineau, C. H., Morel, J. L., & Oudot, J. (1997). Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *Journal of environmental quality*, **26**(6), 1478-1483.
- Chang, B. V., Shiung, L. C. & Yuan, S. Y. (2002). Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere*, **48**(7), 717-724.
- Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S. K. & Joner, E. (2005). Utilising the Synergy between Plants and Rhizosphere Microorganisms to Enhance Breakdown of Organic Pollutants in the Environment. *Environmental Science and Pollution Research*, **12**(1), 34-48.
- Chauhan, A., Fazlurrahman, Oakeshott, J. & Jain, R. (2008). Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, **48**(1), 95-113.
- Cheema, S. A., Khan, M. I., Tang, X., Zhang, C., Shen, C., Malik, Z., Ali, S., Yang, J., Shen, K., Chen, X. & Chen, Y. (2009). Enhancement of phenanthrene and pyrene degradation in rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Journal of Hazardous Materials*, **166**(2-3), 1226-1231.
- Chen, J., Henderson, G., Grimm, C. C., Lloyd, S. W. & Laine, R. A. (1998). Termites fumigate their nests with naphthalene. *Nature*, **392**(6676), 558-559.
- Chen, S.-H. & Aitken, M. D. (1998). Salicylate Stimulates the Degradation of High-Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environmental Science & Technology*, **33**(3), 435-439.
- Chen, Y., Dumont, M. G., Neufeld, J. D., Bodrossy, L., Stralis-Pavese, N., McNamara, N. P., Ostle, N., Briones, M. J. I. & Murrell, J. C. (2008). Revealing the uncultivated majority: combining DNA stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomic analyses of uncultivated *Methylocystis* in acidic peatlands. *Environmental Microbiology*, **10**(10), 2609-2622.
- Cheng, S. M. & Foght, J. M. (2007). Cultivation-independent and -dependent characterization of Bacteria resident beneath John Evans Glacier. *FEMS Microbiology Ecology*, **59**(2), 318-330.
- Chiapusio, G., Pujol, S., Toussaint, M., Badot, P. & Binet, P. (2007). Phenanthrene toxicity and dissipation in rhizosphere of grassland plants (*Lolium perenne* L. and *Trifolium pratense* L.) in three spiked soils. *Plant and Soil*, **294**(1), 103-112.
- Chishaki, N. & Horiguchi, T. (1997). Responses of secondary metabolism in plants to nutrient deficiency (Reprinted from Plant nutrition for sustainable food production and environment, 1997). *Soil Science and Plant Nutrition*, **43**, 987-991.
- Cho, J.-C. & Tiedje, J. M. (2001). Bacterial Species Determination from DNA-DNA Hybridization by Using Genome Fragments and DNA Microarrays. *Applied Environmental Microbiology*, **67**(8), 3677-3682.
- Choi, Y. D. (2004). Theories for ecological restoration in changing environment: Toward 'futuristic' restoration. *Ecological Research*, **19**(1), 75-81.
- Chois, C. M. (2006). Mise en place d'un plan d'expérience pour bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les éléments traces métalliques à l'aide de *Miscanthus x giganteus* et d'un consortium bactérien. *Rapport de stage*, Université Paul Verlaine (IUT Thionville-Yutz), 83 pp.
- Christian, D. G. & Riche, A. B. (1998). Nitrate leaching losses under *Miscanthus* grass planted on a silty clay loam soil. *Soil Use and Management*, **14**, 131-135.
- Chroma, L., Mackova, M., Kucerova, P., In Der Weiche, C., Burkhard, J. & Macek, T. (2002). Enzymes in plant metabolism of PCBs and PAHs. *Acta biotechnologica*, **22**(1-2), 35-41.
- Chuan, M. C., Shu, G. Y. & Liu, J. C. (1996). Solubility of heavy metals in a contaminated soil: Effects of redox potential and pH. *Water, Air & Soil Pollution*, **90**(3), 543-556.
- Chuiko, N. V. & Kurdish, I. K. (2004). The Chemotactic Properties of *Bradyrhizobium japonicum* in the Presence of Natural Fine-Grained Minerals. *Microbiology*, **73**(3), 305-307.
- Churchill, S. A., Harper, J. P. & Churchill, P. F. (1999). Isolation and Characterization of a *Mycobacterium* Species Capable of Degrading Three- and Four-Ring Aromatic and Aliphatic Hydrocarbons. *Applied Environmental Microbiology*, **65**(2), 549-552.
- Cieśliński, G., Van Rees, K. C. J., Szmigielska, A. M., Krishnamurti, G. S. R. & Huang, P. M. (1998). Low-molecular-weight organic acids in rhizosphere soils of durum wheat and their effect on cadmium bioaccumulation. *Plant and Soil*, **203**(1), 109-117.
- Circulaire du 10 décembre 1999. Circulaire du 10 décembre 1999 relative aux sites et sols pollués et aux principes de fixation des objectifs de réhabilitation.
- Circulaire n° 96-85 du 11 octobre 1996. Circulaire n° 96-85 relative aux centres issus de la filtration des gaz de combustion de combustibles d'origine fossile dans des installations classées pour la protection de l'environnement. *BO ministère de l'Équipement*, n°1109-96/93 du 10 décembre 1996.
- Clarke, P. H. (1982). The metabolic versatility of pseudomonads. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **48**(2), 105-30.

- Clifton-Brown, J. C., Stampfl, P. F. & Jones, M. B. (2004). *Miscanthus* biomass production for energy in Europe and its potential contribution to decreasing fossil fuel carbon emissions. *Global Change Biology*, **10**(4), 509-518.
- Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Bandela, A. M., Cardenas, E., Garrity, G. M. & Tiedje, J. M. (2006). The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research*, **35**(suppl 1), D169-D172.
- Collins, C. D. (2007). Implementing Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbons, **23**, 99-108.
- Cookson, J. T. (1995). Bioremediation engineering : design and application. *Editions McGraw-Hill*, New York, 524 p.
- Copley, S. D. (2000). Evolution of a metabolic pathway for degradation of a toxic xenobiotic: the patchwork approach. *Trends in Biochemical Sciences*, **25**(6), 261-265.
- Coppotelli, B., Ibarrolaza, A., Dias, R., Del Panno, M., Berthe-Corti, L. & Morelli, I. (2009). Study of the Degradation Activity and the Strategies to Promote the Bioavailability of Phenanthrene by *Sphingomonas paucimobilis* Strain 20006FA. *Microbial Ecology*, **59**(2), 266-276.
- Corgie, S. C., Beguiristain, T. & Leyval, C. (2004). Spatial Distribution of Bacterial Communities and Phenanthrene Degradation in the Rhizosphere of *Lolium perenne* L. *Applied Environmental Microbiology*, **70**(6), 3552-3557.
- Corgié, S. C., Beguiristain, T. & Leyval, C. (2006). Profiling 16S bacterial DNA and RNA: Difference between community structure and transcriptional activity in phenanthrene polluted sand in the vicinity of plant roots. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**(7), 1545-1553.
- Corgié, S. C., Joner, E. J. & Leyval, C. (2003). Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. *Plant and Soil*, **257**(1), 143-150.
- Cornelissen, G., Rigterink, H., Ferdinandy, M. M. A. & van Noort, P. C. M. (1998). Rapidly Desorbing Fractions of PAHs in Contaminated Sediments as a Predictor of the Extent of Bioremediation. *Environmental Science & Technology*, **32**(7), 966-970.
- Costa, G., Michaut, J. C. & Guckert, A. (1997). Amino acids exuded from axenic roots of lettuce and white lupin seedlings exposed to different cadmium concentrations. *Journal of plant nutrition*, **20**(7-8), 883-900.
- Cottrell, M. T., Waidner, L. A., Yu, L. & Kirchman, D. L. (2005). Bacterial diversity of metagenomic and PCR libraries from the Delaware River. *Environmental Microbiology*, **7**, 1883-1895.
- Crepineau, C., Rychen, G., Feidt, C., Le Roux, Y., Lichtfouse, E. & Laurent, F. (2003). Contamination of Pastures by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Vicinity of a Highway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(16), 4841-4845.
- Crowley, D. E., Luepromechai, E. & Singer, A. (2000). Metabolism of Xenobiotics in the Rhizosphere. *Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms*, **777**, 333-352.
- Cunningham, S. D. & Berti, W. R. (1993). Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, **29**(4), 207-212.
- Cunningham, S. D., Anderson, T. A., Schwab, A. P., Hsu, F. C. & Donald, L. S. (1996). Phytoremediation of Soils Contaminated with Organic Pollutants. *Advances in Agronomy*, **56**, 55-114.
- Curl, E. A., Truelove, B. & Trollenier, G. (1987). The Rhizosphere. (Advanced Series in Agricultural Sciences, Vol. 15) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo, 1986. 288 p, ISBN 3-540-15803-0. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **150**(2), 124-125.

## D

- D'Arcy, A. (1982). Etude des exsudats racinaires de Soja et de Lentille. *Plant and Soil*, **68**(3), 399-403.
- Da Silva, M. L. B., Kamath, R. & Alvarez, P. J. J. (2006). Effect of simulated rhizodeposition on the relative abundance of polynuclear aromatic hydrocarbon catabolic genes in a contaminated soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25**, 386-391.
- Daane, L. L., Harjono, I., Barns, S. M., Launen, L. A., Palleroni, N. J. & Ggblom, M. M. (2002). PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**(1), 131-139.
- Daane, L. L., Harjono, I., Zylstra, G. J. & Haggblom, M. M. (2001). Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria Associated with the Rhizosphere of Salt Marsh Plants. *Applied Environmental Microbiology*, **67**(6), 2683-2691.
- Dabestani, R. & Ivanov, I. N. (1999). A Compilation of Physical, Spectroscopic and Photophysical Properties of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Photochemistry and Photobiology*, **70**(1), 10-34.
- Dadhah, A. A. & Akgerman, A. (2002). Hot water extraction with in situ wet oxidation: PAHs removal from soil. *Journal of Hazardous Materials*, **93**, 307-320.

- Daisy, B. H., Strobel, G. A., Castillo, U., Ezra, D., Sears, J., Weaver, D. K. & Runyon, J. B. (2002). Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, **148**(11), 3737-3741.
- Dakora, F. D. & Phillips, D. A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil*, **245**(1), 35-47.
- Danyi, S., Brose, F., Brasseur, C., Schneider, Y.-J., Larondelle, Y., Pussemier, L., Robbens, J., De Saeger, S., Maghuin-Rogister, G. & Scippo, M.-L. (2009). Analysis of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector. *Analytica Chimica Acta*, **663**(2), 293-299.
- Davey, M. E. & O'Toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**(4), 847-867.
- Davison, J. (1999). Genetic Exchange between Bacteria in the Environment. *Plasmid*, **42**(2), 73-91.
- De Boer, W., Klein Gunnewiek, P. A. & Laanbroek, H. J. (1995). Ammonium-oxidation at low pH by a chemolithotrophic bacterium belonging to the genus *Nitrosospira*. *Soil Biology and Biochemistry*, **27**(2), 127-132.
- Dean-Ross, D., Moody, J. & Cerniglia, C. E. (2002). Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, **41**(1), 1-7.
- Demaneche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M., Willison, J. C. & Jouanneau, Y. (2004). Identification and Functional Analysis of Two Aromatic-Ring-Hydroxylating Dioxygenases from a *Sphingomonas* Strain That Degrades Various Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied Environmental Microbiology*, **70**(11), 6714-6725.
- Denier van der Gon, H., van het Bolscher, M., Visschedijk, A. & Zandveld, P. (2007). Emissions of persistent organic pollutants and eight candidate POPs from UNECE-Europe in 2000, 2010 and 2020 and the emission reduction resulting from the implementation of the UNECE POP protocol. *Atmospheric Environment*, **41**(40), 9245-9261.
- Desai, C. & Madamwar, D. (2007). Extraction of inhibitor-free metagenomic DNA from polluted sediments, compatible with molecular diversity analysis using adsorption and ion-exchange treatments. *Bioresource Technology*, **98**(4), 761-768.
- Di Gennaro, P., Moreno, B., Annoni, E., García-Rodríguez, S., Bestetti, G. & Benitez, E. (2009). Dynamic changes in bacterial community structure and in naphthalene dioxygenase expression in vermicompost-amended PAH-contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, **172**(2-3), 1464-1469.
- Diab, F., Bernard, T., Bazire, A., Haras, D., Blanco, C. & Jebbar, M. (2006). Succinate-mediated catabolite repression control on the production of glycine betaine catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under low and elevated salinities. *Microbiology*, **152**(5), 1395-1406.
- Díaz, E. & Prieto, M. A. (2000). Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, **11**(5), 467-475.
- Dietz, A. C. & Schnoor, J. L. (2001). Advances in phytoremediation. *Environ Health Perspect*, **109**, 163-8.
- Dighton, J. (2001). The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface. *Soil Science*, **166**(8), 566-568.
- Dinger, F. & Falcy, J. P. (2002). Utilisation de compost de déchets verts pour la réhabilitation des parcs à cendres volantes: l'exemple de l'ancienne centrale thermique de Pont-sur-Sambre (Nord). *Ingénieries* N° 32 p. 65 à 78.
- Djurdjević, L., Mitrović, M., Pavlović, P., Gajić, G. & Kostić, O. (2006). Phenolic Acids as Bioindicators of Fly Ash Deposit Revegetation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **50**(4), 488-495.
- Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K. & Mattick, J. S. (1991). 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*, **19**(14), 4008.
- Dong, Q., Springeal, D., Schoeters, J., Nuyts, G., Mergeay, M. & Diels, L. (1998). Horizontal transfer of bacterial heavy metal resistance genes and its applications in activated sludge systems. *Water Science and Technology*, **37**(4-5), 465-468.
- Doyle, E., Muckian, L., Hickey, A. M. & Clipson, N. (2008). Microbial PAH Degradation. *Advances in Applied Microbiology*, **65**, 27-66.
- DREALL. (2010). Profil environnemental de la Lorraine – 2010; Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de Lorraine: [www.lorraine.developpement-durable.gouv.fr](http://www.lorraine.developpement-durable.gouv.fr), 100 p.
- Duetz, W. A., Marques, S., Wind, B., Ramos, J. L. & van Andel, J. G. (1996). Catabolite repression of the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* harboring pWW0 under various conditions of nutrient limitation in chemostat culture. *Applied Environmental Microbiology*, **62**(2), 601-606.
- Dunbar, J. M., Stark, P. C., Robison, T. W. & Lazarin, R. A. (2007). Methods and compositions for the removal of nucleic acid amplification inhibitors. *United States Patent Application US2007/0,065,841A1, United States*.

- Dzantor, D. E. (2007). Phytoremediation : the state of rhizosphere 'engineering' for accelerated rhizodegradation of xenobiotic contaminants. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **82**(3), 228-232.
- Dzantor, E. K., Chekol, T. & Vough, L. R. (2000). Feasibility of using forage grasses and legumes for phytoremediation of organic pollutants. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, **35**(9), 1645 - 1661.

## E

- Eaton, R. W. & Chapman, P. J. (1992). Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. *Journal of Bacteriology*, **174**(23), 7542-7554.
- Ebrahim Mohsen, K. H. (2004). Comparison, determination and optimizing the conditions required for rhizome and shoot formation, and flowering of in vitro cultured calla explants. *Scientia horticulturae*, **101**(3), 305-313.
- Eckert, B., Weber, O. B., Kirchof, G., Halbritter, A., Stoffels, M. & Hartmann, A. (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C<sub>4</sub>-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**(1), 17-26.
- Edwards, N. T. (1983). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH's) in the Terrestrial Environment A Review. *Journal of Environmental Quality*, **12**(4), 427-441.
- Egan, C. J. (1976). Method of power generation via coal gasification and liquid hydrocarbon synthesis. *United States Patent 3986349*, 10 p.
- Eganhouse, R. P. & Calder, J. A. (1976). The solubility of medium molecular weight aromatic hydrocarbons and the effects of hydrocarbon co-solutes and salinity. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **40**(5), 555-561.
- El Yamani, M. (2006). Santé et Environnement : enjeux et clés de lecture, Environnement et milieux : sites et sols pollués; AFSSET.
- Elmogazi, D., Lisk, D. J. & Weinstein, L. H. (1988). A Review of Physical, Chemical, and Biological Properties of Fly-Ash and Effects on Agricultural Ecosystems. *Science of the Total Environment*, **74**, 1-37.
- Engelbreton, R. R., Von, W. & R. (1994). Micro-organization in dissolved humic acids. *Environmental Science & Technology*, **28**(11), 1934-1941.
- Eom, I. C., Rast, C., Veber, A. M. & Vasseur, P. (2007). Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **67**(2), 190-205.
- Erdogdu, K. & Türker, P. (1998). Effects of fly ash particle size on strength of portland cement fly ash mortars. *Cement and concrete research*, **28**(9), 1217-1222.
- Erickson, L. E., Davis, L. C. & Narayanan, M. (1995). Bioenergetics and bioremediation of contaminated soil. *Thermochimica Acta*, **250**(2), 353-358.
- Erol, M., Genç, A., Öveçoglu, M. L., Yücelen, E., Küçükbayrak, S. & Taptık, Y. (2000). Characterization of a glass-ceramic produced from thermal power plant fly ashes. *Journal of the European Ceramic Society*, **20**(12), 2209-2214.
- Euliss, K., Ho, C. H., Schwab, A. P., Rock, S. & Banks, M. K. (2008). Greenhouse and field assessment of phytoremediation for petroleum contaminants in a riparian zone. *Bioresource Technology*, **99**(6), 1961-1971.
- Ezaki, B., Nagao, E., Yamamoto, Y., Nakashima, S. & Enomoto, T. (2008). Wild plants, *Andropogon virginicus* L. and *Miscanthus sinensis* Anders, are tolerant to multiple stresses including aluminum, heavy metals and oxidative stresses. *Plant Cell Reports*, **27**(5), 951-961.

## F

- Fail, J. & Wochok, Z. (1977). Soybean growth on fly ash amended strip mine spoils. *Plant and Soil*, **48**(2), 473-484.
- Fang, K.-T., Lin, D. K. J., Winker, P. & Zhang, Y. (2000). Uniform design : Theory and application. *Technometrics*, **42**(3), 237-248.
- Farrar, J. F. & Jones, D. L. (2000). The control of carbon acquisition by roots. *New Phytologist*, **147**(1), 43-53.
- Fent, K. (2004). Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, **205**(3), 223-240.
- Fent, K. (2003). Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*, **140-141**, 353-365.
- Fernandez-Martinez, G., Lopez-Mahia, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodriguez, D. & Fernandez-Fernandez E. (2001). Distribution of volatile organic compounds during the combustion process in coal-fired power stations. *Atmospheric environment*, **35**(33), 5823-5831.

- Fernando, A. L., Godovikova, V. & Oliveira, J. F. S. (2004). *Miscanthus x Giganteus*: Contribution to a Sustainable Agriculture of a Future/Present - Oriented Biomaterial. *Materials Science Forum*, **455-456**, 437-441.
- Field, J. A., de Jong, E., Feijoo Costa, G. & de Bont, J. A. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied Environmental Microbiology*, **58**(7), 2219-2226.
- Fierer, N., Bradford, M. A. & Jackson, R. B. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, **88**(6), 1354-64.
- Fierer, N. & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(3), 626-631.
- Fismes, J. I., Perrin-Ganier, C., Empereur-Bissonnet, P. & Morel, J. L. (2002). Soil-to-Root Transfer and Translocation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Vegetables Grown on Industrial Contaminated Soils. *Journal of Environmental Quality*, **31**(5), 1649-1656.
- Fletcher, J. S. & Hegde, R. S. (1995). Release of phenols by perennial plant roots and their potential importance in bioremediation. *Chemosphere*, **31**(4), 3009-3016.
- Flocco, C. G., Lindblom, S. D. & Smits, E. A. (2004). Overexpression of enzymes involved in glutathione synthesis enhances tolerance to organic pollutants in *Brassica juncea*. *International Journal of Phytoremediation*, **6**(4), 289-304.
- Formánek, P., Klejdus, B. & Vranová, V. (2005). Bio-available amino acids extraction from soil by demineralized water and 0.5M ammonium acetate. *Amino Acids*, **28**(4), 427-429.
- Fortin, N., Beaumier, D., Lee, K. & Greer, C. W. (2004). Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. *Journal of Microbiological Methods*, **56**(2), 181-191.
- Fouquet, C. (2006). La modélisation géostatistique des milieux anthropisés. *Habilitation à diriger des recherches*, Université Pierre et Marie Curie, Mémoire des Sciences de la Terre N° **2006-13**.
- Foy, C. D., Chaney, R. L. & White, M. C. (1978). The Physiology of Metal Toxicity in Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **29**(1), 511-566.
- Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X. & Simonet, P. (1999). Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied Environmental Microbiology*, **65**(12), 5409-20.
- Furr, A. K., Parkinson, T. F., Hinrichs, R. A., Van Campen, D. R., Bache, C. A., Gutenmann, W. H., St. John, L. E., Pakkala, I. S. & Lisk, D. J. (1977). National survey of elements and radioactivity in fly ashes. Absorption of elements by cabbage grown in fly ash-soil mixtures. *Environmental Science & Technology*, **11**(13), 1194-1201.

## G

- Gaines, G. L., 3rd, Smith, L. & Neidle, E. L. (1996). Novel nuclear magnetic resonance spectroscopy methods demonstrate preferential carbon source utilization by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Bacteriology*, **178**(23), 6833-6841.
- Gan, S., Lau, E. V. & Ng, H. K. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*, **172**(2-3), 532-549.
- Gao, Y., Li, Q., Ling, W. & Zhu, X. (2010). Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soils contaminated with phenanthrene and pyrene. *Journal of Hazardous Materials*, In Press, Corrected Proof.
- Gao, Y., Ren, L., Ling, W., Gong, S., Sun, B. & Zhang, Y. (2010). Desorption of phenanthrene and pyrene in soils by root exudates. *Bioresource Technology*, **101**(4), 1159-1165.
- Gao, Y. & Zhu, L. (2004). Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere*, **55**(9), 1169-1178.
- García-Gil, J. C., Plaza, C., Soler-Rovira, P. & Polo, A. (2000). Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**(13), 1907-1913.
- Gaskin, S. & Bentham, R. (2005). Comparison of enrichment methods for the isolation of pyrene-degrading bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **56**(2), 80-85.
- Gerhardt, K. E., Huang, X.-D., Glick, B. R. & Greenberg, B. M. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*, **176**(1), 20-30.
- Gerischer, U. (2002). Specific and global regulation of genes associated with the degradation of aromatic compounds in bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **4**(2), 111-121.
- Germida, J. J., Frick, C. M., Farrell, R. E., Violante, A., Huang, P. M. & Bollag, J. M. (2002). Phytoremediation of oil-contaminated soils. *Developments in Soil Science*, **28**, 169-186.

- Ghodrati, M., Sims, J. T. & Vasilas, B. L. (1995). Evaluation of fly ash as a soil amendment for the Atlantic Coastal Plain: I. Soil hydraulic properties and elemental leaching. *Water, Air & Soil Pollution*, **81**(3), 349-361.
- Gianfreda, L. & Rao, M. A. (2004). Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, **35**(4), 339-354.
- Gibson, D. T., Mahadevan, V., Jerina, D. M., Yogi, H. & Yeh, H. J. (1975). Oxidation of the carcinogens benzo [a] pyrene and benzo [a] anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science*, **189**(4199), 295-297.
- Gibson, D. T. & Parales, R. E. (2000). Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, **11**(3), 236-243.
- Giovannoni, S. J., Foster, R. A., Rappe, M. S. & Epstein, S. (2007). New Cultivation Strategies Bring More Microbial Plankton Species into the Laboratory. *Oceanography*, **20**(2), 62-69.
- Goi, A., Trapido, M., Kulik, N., Palmroth, M. R. T. & Tuhkanen, T. (2006). Ozonation and fenton treatment for remediation of diesel fuel contaminated soil. *Ozone: Science and Engineering*, **28**(1), 37-46.
- Gomes, N. C. M., Fagbola, O., Costa, R., Rumjanek, N. G., Buchner, A., Mendona-Hagler, L. & Smalla, K. (2003). Dynamics of Fungal Communities in Bulk and Maize Rhizosphere Soil in the Tropics. *Applied Environmental Microbiology*, **69**(7), 3758-3766.
- Gomez-Ruiz, J. A. & Wenzl, T. (2009). Evaluation of gas chromatography columns for the analysis of the 15 + 1 EU-priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Analytical and bioanalytical chemistry*, **393**(6-7), 1697-1707.
- Gonzalez, J. M., Portillo, M. C. & Saiz-Jimenez, C. (2005). Multiple displacement amplification as a pre-polymerase chain reaction (pre-PCR) to process difficult to amplify samples and low copy number sequences from natural environments. *Environmental Microbiology*, **7**(7), 1024-1028.
- Gorse, R. A., Riley, T. L., Ferris, F. C., Pero, A. M. & Skewes, L. M. (1983). 1-Nitropyrene concentration and bacterial mutagenicity in on-road vehicle particulate emissions. *Environmental Science & Technology*, **17**(4), 198-202.
- Gould, W. D., Hagedorn, C., Bardinelli, T. R. & Zablotowicz, R. M. (1985). New Selective Media for Enumeration and Recovery of Fluorescent Pseudomonads from Various Habitats. *Applied Environmental Microbiology*, **49**(1), 28-32.
- Goumans, J. J. J. M., van der Sloot, H. A. & Aalbers, Th. G. (1994). Environmental aspects of construction with waste materials : proceeding[s] of the International Conference on Environmental Implications of Construction Materials and Technology Developments, *Maastricht, the Netherlands, 1-3 June 1994, Studies in environmental science*, **60**, 988 p.
- Goyal, A. K. & Zylstra, G. J. (1996). Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Applied Environmental Microbiology*, **62**(1), 230-6.
- Grayston, S. J., Vaughan, D. & Jones, D. (1997). Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology*, **5**(1), 29-56.
- Greef, J. M. & Deuter, M. (1993). Syntaxonomy of *Miscanthus-X-Giganteus* Greef-Et-Deu. *Angewandte Botanik*, **67**(3-4), 87-90.
- Grosser, R. J., Warshawsky, D. & Vestal, J. R. (1991). Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene, and carbazole in soils. *Applied Environmental Microbiology*, **57**(12), 3462-3469.
- Gruber, C. (2005). Identification des métabolites du pyrène après dégradation bactérienne et étude de leur toxicité sur les THP-1. *Rapport des travaux de D.E.A. en Toxicologie de l'Environnement*, Université Paul Verlaine -Metz.
- Gruber, C. & Py, N. (2004). Participation au lancement d'une filière complète de valorisation biomasse et bioremédiation. *Travail réalisé dans le cadre d'une aide aux travaux personnels d'étudiants de l'enseignement supérieur, avec le soutien de l'ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) (projet FLORBIO, filière lorraine de valorisation bioénergétique et biomatériaux)*.
- Grund, E., Denecke, B. & Eichenlaub, R. (1992). Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. *Applied Environmental Microbiology*, **58**(6), 1874-1877.
- Gudin, C. & Syrratt, W. J. (1975). Biological aspects of land rehabilitation following hydrocarbon contamination. *Environmental Pollution (1970)*, **8**(2), 107-112.
- Guggenberger, G., Pichler, M., Hartmann, R. & Zech, W. (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbons in different forest soils : Mineral horizons. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **159**(6), 565-573.
- Günther, T., Dornberger, U. & Fritsche, W. (1996). Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere*, **33**(2), 203-215.
- Guoqing, S., Yitong, L. & Jingbo, H. (2006). Combined effect of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons on urease activity in soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **63**(3), 474-480.

Gurska, J., Wang, W., Gerhardt, K. E., Khalid, A. M., Isherwood, D. M., Huang, X.-D., Glick, B. R. & Greenberg, B. M. (2009). Three Year Field Test of a Plant Growth Promoting Rhizobacteria Enhanced Phytoremediation System at a Land Farm for Treatment of Hydrocarbon Waste. *Environmental Science & Technology*, **43**(12), 4472-4479.

## H

- Habe, H. & Omori, T. (2003). Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **67**(2), 225-243.
- Haber, F., Leduc-Brunet, M. & Valon, R. (2003). Valorisation des co-produits de l'industrie en génie civil : valorisation des cendres volantes, Centre d'études techniques de l'équipement de l'est, CRCIL, ADEME, Agence régionale de l'environnement en Lorraine, DRIRE Lorraine.
- Haeseler, F., Blanchet, D., Druelle, V., Werner, P. & Vandecasteele, J.-P. (1999). Analytical Characterization of Contaminated Soils from Former Manufactured Gas Plants. *Environmental Science & Technology*, **33**(6), 825-830.
- Haines, J. R., Wrenn, B. A., Holder, E. L., Strohmeier, K. L., Herrington, R. T. & Venosa, A. D. (1996). Measurement of hydrocarbon-degrading microbial populations by a 96-well plate most-probable-number procedure. *Journal of Indian Microbiology*, **16**(1), 36-41.
- Hallin, S., Throback, I. N., Dicksved, J. & Pell, M. (2006). Metabolic Profiles and Genetic Diversity of Denitrifying Communities in Activated Sludge after Addition of Methanol or Ethanol. *Applied Environmental Microbiology*, **72**(8), 5445-5452.
- Hamamura, N., Olson, S. H., Ward, D. M. & Inskeep, W. P. (2006). Microbial Population Dynamics Associated with Crude-Oil Biodegradation in Diverse Soils. *Applied Environmental Microbiology*, **72**(9), 6316-6324.
- Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadzianas, L., Aoyama, I. & Jedidi, N. (2007). Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, **39**(8), 1926-1935.
- Han, Y. C., Teng, C. Z., Hu, Z. L. & Song, Y. C. (2008). An optimal method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **29**(6), 1355-8.
- Hansen, J. & Kristiansen, K. (1997). Short-term in vitro storage of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus' as affected by medium composition, temperature, and photon flux density. *Plant cell, tissue and organ culture*, **49**(3), 161-169.
- Haritash, A. K. & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, **169**(1-3), 1-15.
- Harrison, M. J. (1997). The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. *Trends in plant science*, **2**(2), 54-60.
- Bais, H. P., Park, S.-W., Weir, T. L., Callaway, R. M. & Vivanco, J. M. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science*, **9**(1), 26-32.
- Hasspieler, B. M., Di Giulio, R. T. (1994). Dicoumarol-sensitive NADPH : phenanthrenequinone oxidoreductase in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Toxicology and applied pharmacology*, **125**(2), 184-191.
- Hawkes, C. V., DeAngelis, K. M., Firestone, M. K., Zoe, G. C. & Julie, L. W. (2007). Root Interactions with Soil Microbial Communities and Processes. *The Rhizosphere*, 1-29.
- Haynes, R. J. (2009). Reclamation and revegetation of fly ash disposal sites - Challenges and research needs. *Journal of Environmental Management*, **90**(1), 43-53.
- He, Y., Yediler, A., Sun, T. & Kettrup, A. (1995). Adsorption of fluoranthene on soil and lava: Effects of the organic carbon contents of adsorbents and temperature. *Chemosphere*, **30**(1), 141-150.
- Heaton, E., Voigt, T. & Long, S. P. (2004). A quantitative review comparing the yields of two candidate C<sub>4</sub> perennial biomass crops in relation to nitrogen, temperature and water. *Biomass and Bioenergy*, **27**(1), 21-30.
- Heaton, E. A., Dohleman, F. G., Miguez, A. F., Juvik, J. A., Lozovaya, V., Widholm, J., Zobotina, O. A., McIsaac, G. F., David, M. B., Voigt, T. B., Boersma, N. N., Long, S. P. & Jean-Claude Kader and Michel, D. (2010). *Miscanthus*: A Promising Biomass Crop. *Advances in Botanical Research*, **56**, 75-137.
- Heaton, E. A., Long, S. P., Voigt, T. B., Jones, M. B. & Clifton-Brown, J. (2004). *Miscanthus* for Renewable Energy Generation: European Union Experience and Projections for Illinois. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, **9**(4), 433-451.
- Hegde, R. S. & Fletcher, J. S. (1996). Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology. *Chemosphere*, **32**(12), 2471-2479.

- Heitkamp, M. A., Franklin, W. & Cerniglia, C. E. (1988). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Applied Environmental Microbiology*, **54**(10), 2549-2555.
- Heitkamp, M. A., Freeman, J. P., Miller, D. W. & Cerniglia, C. E. (1988). Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. *Applied Environmental Microbiology*, **54**(10), 2556-2565.
- Herrick, J. B., Stuart-Keil, K. G., Ghiorse, W. C. & Madsen, E. L. (1997). Natural horizontal transfer of a naphthalene dioxygenase gene between bacteria native to a coal tar-contaminated field site. *Applied Environmental Microbiology*, **63**(6), 2330-2337.
- Hiltner, L. (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, **98**, 59-78.
- Higgins, C. E., Griest, W. H., Caton, J. E. & Harmon, S. H. (1983). Thermal-desorption gas chromatographic procedure for screening coal fly ash for volatile organic compounds. *Analytica Chimica Acta*, **154**, 173-180.
- Hinoue, M., Fukuda, K., Wan, Y., Yamauchi, K., Ogawa, H. & Taniguchi, H. (2004). An effective method for extracting DNA from contaminated soil due to industrial waste. *J UOEH*, **26**(1), 13-21.
- Hirsch, P. R., Mauchline, T. H. & Clark, I. M. (2010). Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**(6), 878-887.
- Ho, Y., Jackson, M., Yang, Y., Mueller, J. G. & Pritchard, P. H. (2000). Characterization of fluoranthene- and pyrene-degrading bacteria isolated from PAH-contaminated soils and sediments. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **24**(2), 100-112.
- Hodkinson, T. R., Chase, M. W. & Renvoize, S. A. (2002). Characterization of a Genetic Resource Collection for *Miscanthus* (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) using AFLP and ISSR PCR. *Annals of Botany*, **89**(5), 627-636.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**(16), 7276-7280.
- Huang, X.-D., El-Alawi, Y., Penrose, D. M., Glick, B. R. & Greenberg, B. M. (2004). A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental Pollution*, **130**(3), 465-476.
- Huesemann, M. H. (1997). Incomplete Hydrocarbon Biodegradation in Contaminated Soils: Limitations in Bioavailability or Inherent Recalcitrance? *Bioremediation Journal*, **1**(1), 27 - 39.
- Huesemann, M. H., Hausmann, T. S. & Fortman, T. J. (2004). Does Bioavailability Limit Biodegradation? A Comparison of Hydrocarbon Biodegradation and Desorption Rates in Aged Soils. *Biodegradation*, **15**(4), 261-274.
- Hugues, B. & Plantat, J. L. (1982). Calcul du nombre le plus probable et de son intervalle de confiance dans le cas ou le nombre d'inoculums par dilution est important : Calcul of the most probable number and its confidence limit when the number of inoculum per dilution is considerable. *Chemosphere*, **11**(11), 1135-1140.
- Hwang, S. & Cutright, T. J. (2002). Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. *Chemosphere*, **47**(9), 891-899.

## I

- INERIS. (2001). Méthode de calcul des Valeurs de Constat d'Impact dans les sols. *INERIS DRC-01-25587-DESP-R01*.
- Inskip, W, P. & Bloom, P. R. (1985). Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiology*, **77**(2), 483-485.
- ISO 11268-1:1993. Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) -- Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate.

## J

- Jala, S. & Goyal, D. (2006). Fly ash as a soil ameliorant for improving crop production--a review. *Bioresource Technology*, **97**(9), 1136-1147.
- Jankowski, J., Ward, C. R., French, D. & Groves, S. (2006). Mobility of trace elements from selected Australian fly ashes and its potential impact on aquatic ecosystems. *Fuel*, **85**(2), 243-256.

- Janse, I., Bok, J. & Zwart, G. (2004). A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, **57**(2), 279-81.
- Jeon, C. O., Park, M., Ro, H. S., Park, W. & Madsen, E. L. (2006). The naphthalene catabolic (nag) genes of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2: evolutionary implications for two gene clusters and novel regulatory control. *Applied Environmental Microbiology*, **72**(2), 1086-95.
- Johnsen, A. & Karlson, U. (2005). PAH Degradation Capacity of Soil Microbial Communities—Does It Depend on PAH Exposure? *Microbial Ecology*, **50**(4), 488-495.
- Johnsen, A. R. & Karlson, U. (2007). Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **76**(3), 533-43.
- Johnsen, A. R. & Karlson, U. (2004). Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **63**(4), 452-459.
- Johnsen, A. R., Wick, L. Y. & Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, **133**(1), 71-84.
- Johnsen, A. R., Winding, A., Karlson, U. & Roslev, P. (2002). Linking of Microorganisms to Phenanthrene Metabolism in Soil by Analysis of <sup>13</sup>C-Labeled Cell Lipids. *Applied Environmental Microbiology*, **68**(12), 6106-6113.
- Johnson, M., Tucker, N., Barnes, S. & Kirwan, K. (2005). Improvement of the impact performance of a starch based biopolymer via the incorporation of *Miscanthus giganteus* fibres. *Industrial Crops and Products*, **22**(3), 175-186.
- Joner, E. J., Corgié, S. C., Amellal, N. & Leyval, C. (2002). Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, **34**(6), 859-864.
- Joner, E. J., Hirmann, D., Szolar, O. H. J., Todorovic, D., Leyval, C. & Loibner, A. P. (2004). Priming effects on PAH degradation and ecotoxicity during a phytoremediation experiment. *Environmental Pollution*, **128**(3), 429-435.
- Joner, E. J. & Leyval, C. (2003). Rhizosphere Gradients of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Dissipation in Two Industrial Soils and the Impact of Arbuscular Mycorrhiza. *Environmental Science & Technology*, **37**(11), 2371-2375.
- Joner, E. J., Leyval, C. & Colpaert, J. V. (2006). Ectomycorrhizas impede phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) both within and beyond the rhizosphere. *Environmental Pollution*, **142**(1), 34-38.
- Jones, D. L., Darrah, P. R. & Kochian, L. V. (1996). Critical evaluation of organic acid mediated iron dissolution in the rhizosphere and its potential role in root iron uptake. *Plant and Soil*, **180**(1), 57-66.
- Jones, D. L. (1998). Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil*, **205**(1), 25-44.
- Jones, D. L., Hodge, A. & Kuzyakov, Y. (2004). Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist*, **163**(3), 459-480.
- Jonker, M. T. O., Van Der Heijden, S. A., Kreitinger, J. P. & Hawthorne, S. B. (2007). Predicting PAH bioaccumulation and toxicity in earthworms exposed to manufactured gas plant soils with solid-phase microextraction. *Environmental science & technology*, **41**(21), 7472-7478.
- Jørgensen, R. N., Jørgensen, B. J., Nielsen, N. E., Maag, M. & Lind, A.-M. (1997). N<sub>2</sub>O emission from energy crop fields of *Miscanthus "Giganteus"* and winter rye. *Atmospheric Environment*, **31**(18), 2899-2904.
- Jouanneau, Y., Meyer, C., Jakoncic, J., Stojanoff, V. & Gaillard, J. (2006). Characterization of a Naphthalene Dioxygenase Endowed with an Exceptionally Broad Substrate Specificity toward Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Biochemistry*, **45**(40), 12380-12391.
- Juhasz, A. L., Stanley, G. A. & Britz, M. L. (2002). Metabolite repression inhibits degradation of benzo[a]pyrene and dibenz[a, h]anthracene by *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,003. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **28**(2), 88-96.
- Juhasz, A., Britz, M. & Stanley, G. (1997). Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*. *Journal of Applied Microbiology*, **83**(2), 189-198.
- Juhasz, A., Britz, M. & Stanley, G. (1996). Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*. *Biotechnology Letters*, **18**(5), 577-582.
- Juhasz, A. L. & Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **45**(1-2), 57-88.
- Juhasz, A. L., Stanley, G. A. & Britz, M. L. (2000). Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Letters in Applied Microbiology*, **30**(5), 396-401.
- Jurgens, A., Webber, A. C. & Gottsberger, G. (2000). Floral scent compounds of Amazonian *Annonaceae* species pollinated by small beetles and thrips. *Phytochemistry*, **55**(6), 551-8.

- Jussila, M. M., Zhao, J., Suominen, L. & Lindström, K. (2007). TOL plasmid transfer during bacterial conjugation *in vitro* and rhizoremediation of oil compounds *in vivo*. *Environmental Pollution*, 146(2), 510-524.
- Justesen, U., Arrigoni, E., Larsen, B. R. & Amado, R. (2000). Degradation of Flavonoid Glycosides and Aglycones During *in vitro* Fermentation with Human Faecal Flora. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 33(6), 424-430.

## K

- Kaack, K. & Schwarz, K.-U. (2001). Morphological and mechanical properties of *Miscanthus* in relation to harvesting, lodging, and growth conditions. *Industrial Crops and Products*, 14, 145-154.
- Kahle, P., Beuch, S., Boelcke, B., Leinweber, P. & Schulten, H.-R. (2001). Cropping of *Miscanthus* in Central Europe: biomass production and influence on nutrients and soil organic matter. *European Journal of Agronomy*, 15(3), 171-184.
- Kalf, D. F., Crommentuijn, T. & van de Plassche, E. J. (1997). Environmental Quality Objectives for 10 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 36(1), 89-97.
- Kalra, N., Joshi, H. C., Chaudhary, A., Choudhary, R. & Sharma, S. K. (1997). Impact of fly ash incorporation in soil on germination of crops. *Bioresource Technology*, 61(1), 39-41.
- Kamath, R., Schnoor, J. L., Alvarez, P. J. (2004). Effect of root-derived substrates on the expression of nah-lux genes in *Pseudomonas fluorescens* HK44: Implications for PAH biodegradation in the rhizosphere. *Environmental Science and Technology*, 38(6), 1740-1745.
- Kamath, R., Rentz, J. A., Schnoor, J. L., Alvarez, P. J. J., Rafael, V.-D. & Rodolfo, Q.-R. (2004). Chapter 16 Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils: principles and applications. *Studies in Surface Science and Catalysis*, 151, 447-478.
- Kanaly, R. A., Bartha & R. (1999). Cometabolic mineralization of benzo[a]pyrene caused by hydrocarbon additions to soil. SETAC, Pensacola, FL, ETATS-UNIS.
- Kanaly, R. A., Bartha, R., Watanabe, K. & Harayama, S. (2000). Rapid Mineralization of Benzo[a]pyrene by a Microbial Consortium Growing on Diesel Fuel. *Applied Environmental Microbiology*, 66(10), 4205-4211.
- Kanaly, R. A. & Harayama, S. (2010). Advances in the field of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Microbial Biotechnology*, 3(2), 136-164.
- Kanaly, R. A. & Harayama, S. (2000). Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2059-2067.
- Kanaly, R. A., Harayama, S. & Watanabe, K. (2002). Rhodanobacter sp. Strain BPC1 in a Benzo[a]pyrene-Mineralizing Bacterial Consortium. *Applied Environmental Microbiology*, 68(12), 5826-5833.
- Kanaly, R. A. & Watanabe, K. (2004). Multiple mechanisms contribute to the biodegradation of benzo[a]pyrene by petroleum-derived multicomponent nonaqueous-phase liquids. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4), 850-856.
- Kaplan, C. W. & Kitts, C. L. (2004). Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. *Applied Environmental Microbiology*, 70(3), 1777-1786.
- Karickhoff, S. W., Brown, D. S. & Scott, T. A. (1979). Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Research*, 13(3), 241-248.
- Karlovsky, P., Bais, H. P., Broeckling, C. D. & Vivanco, J. M. (2008). Root Exudates Modulate Plant—Microbe Interactions in the Rhizosphere. *Secondary Metabolites in Soil Ecology*, 14, 241-252.
- Karlovsky, P., Reuben, S., Bhinu, V. S. & Swarup, S. (2008). Rhizosphere Metabolomics: Methods and Applications. *Secondary Metabolites in Soil Ecology*, 14, 37-68.
- Kästner, M. (2008). Degradation of Aromatic and Polyaromatic Compounds. *Biotechnology: Environmental Processes II, Volume 11b, Second Edition*, eds H.-J. Rehm and G. Reed, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 211-239.
- Kastner, M., Breuer-Jammali, M. & Mahro, B. (1998). Impact of Inoculation Protocols, Salinity, and pH on the Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Survival of PAH-Degrading Bacteria Introduced into Soil. *Applied Environmental Microbiology*, 64(1), 359-362.
- Kästner, M., Breuer-Jammali, M. & Mahro, B. (1994). Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(2), 267-273.
- Katona, Z. F., Sass, P. & Molnar-Perl, I. (1999). Simultaneous determination of sugars, sugar alcohols, acids and amino acids in apricots by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, ISC'98 International Symposium on Chromatography N°22, Rome, ITALIE (13/09/1998), 847(1-2), 91-102.

- Kaye, J. P. & Hart, S. C. (1997). Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in ecology & evolution*, **12**(4), 139-143.
- Keck, J., Sims, R. C., Coover, M., Park, K. & Symons, B. (1989). Evidence for cooxidation of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil. *Water Research*, **23**(12), 1467-1476.
- Keith, L. & Telliard, W. (1979). ES&T Special Report: Priority pollutants: I-a perspective view. *Environmental Science & Technology*, **13**(4), 416-423.
- Kenealy, W. R. & Jeffries, T. W. (2003). Rapid 2,2'-bicinechonic-based xylanase assay compatible with high throughput screening. *Biotechnology Letters*, **25**(19), 1619-1623.
- Kerven, G. L., Menzies, N. W. & Geyer, M. D. (2000). Soil carbon determination by high temperature combustion: A comparison with dichromate oxidation procedures and the influence of charcoal and carbonate carbon on the measured value. *Communications in soil science and plant analysis*, International Symposium on Soil and Plant Analysis N°6, Brisbane, Queensland , AUSTRALIE (22/03/1999), **31**(11-14), 1935-1939.
- Khalifah, R. G., Baynes, J. W. & Hudson, B. G. (1999). Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **257**(2), 251-8.
- Khan, A. A., Kim, S. J., Paine, D. D. & Cerniglia, C. E. (2002). Classification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Mycobacterium* sp. strain PYR-1, as *Mycobacterium vanbaalenii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**(6), 1997-2002.
- Khan, A. G. (2006). Mycorrhizoremediation - an enhanced form of phytoremediation. *Journal of Zhejiang University Science B.*, **7**(7), 503-514.
- Khan, F. I., Husain, T. & Hejazi, R. (2004). An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*, **71**(2), 95-122.
- Khan, M. R. & Singh, W. N. (2001). Effects of soil application of fly ash on the fusarial wilt on tomato cultivars. *International Journal of Pest Management*, **47**(4), 293 - 297.
- Khandkar, U. R., Gangwar, M. S., Srivastava, P. C. & Singh, M. (1993). Edaphological characteristics of unweathered and weathered fly ashes from Gondwana and lignite coal. *Environmental Pollution*, **79**(3), 297-302.
- Khodadoust, A. P., Bagchi, R., Suidan, M. T., Brenner, R. C. & Sellers, N. G. (2000). Removal of PAHs from highly contaminated soils found at prior manufactured gas operations. *Journal of Hazardous Materials*, **80**(1-3), 159-174.
- Kim, S.-J., Kweon, O., Jones, R. C., Freeman, J. P., Edmondson, R. D. & Cerniglia, C. E. (2007). Complete and Integrated Pyrene Degradation Pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 Based on Systems Biology. *Journal of Bacteriology*, **189**(2), 464-472.
- Kim, Y.-H., Moody, J. D., Freeman, J. P., Brezna, B., Engesser, K.-H. & Cerniglia, C. E. (2004). Evidence for the existence of PAH-quinone reductase and catechol-methyltransferase in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **31**(11), 507-516.
- Kim, Y. H., Engesser, K. H. & Cerniglia, C. E. (2003). Two polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone reductases from a pyrene-degrading *Mycobacterium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **416**(2), 209-17.
- Kim, Y. M., Ahn, C. K., Woo, S. H., Jung, G. Y. & Park, J. M. (2009). Synergic degradation of phenanthrene by cultures mixtes of newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*, **144**(4), 293-298.
- Kirchhof, G., Reis, V. M., Baldani, J. I., Eckert, B. Döbereiner, J. & Hartmann, A. (1997). Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant and Soil*, Congrès Working Group Meeting of the Frontier Project on Nitrogen Fixation in Rice N°2, Faisalabad , PAKISTAN (13/10/1996), **194**(1-2), 45-55.
- Klubek, B., Carlson, C. L., Oliver, J. & Adriano, D. C. (1992). Characterization of microbial abundance and activity from three coal ash basins. *Soil biology & biochemistry*, **24**(11), 1119-1125.
- Knicker, H., Müller, P. & Hilscher, A. (2007). How useful is chemical oxidation with dichromate for the determination of "Black Carbon" in fire-affected soils? *Geoderma*, **142**(1-2), 178-196.
- Kochian, L. V. (1995). Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **46**(1), 237-260.
- Kotterman, M. J. J., Vis, E. H. & Field, J. A. (1998). Successive Mineralization and Detoxification of Benzo[a]pyrene by the White Rot Fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55 and Indigenous Microflora. *Applied Environmental Microbiology*, **64**(8), 2853-2858.
- Kozlova, E. V., Puntus, I. F., Slepkin, A. V. & Boronin, A. M. (2004). Naphthalene degradation by *Pseudomonas putida* strains in soil model systems with arsenite. *Process Biochemistry*, **39**(10), 1305-1308.
- Krafczyk, I., Trollenier, G. & Beringer, H. (1984). Soluble root exudates of maize: Influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, **16**(4), 315-322.

- Krivobok, S., Kuony, S., Meyer, C., Louwagie, M., Willison, J. C. & Jouanneau, Y. (2003). Identification of Pyrene-Induced Proteins in *Mycobacterium* sp. Strain 6PY1: Evidence for Two Ring-Hydroxylating Dioxygenases. *Journal of Bacteriology*, **185**(13), 3828-3841.
- Krogstad, T., Sogn, T. A., Asdal, Å. & Sæbø, A. (2005). Influence of chemically and biologically stabilized sewage sludge on plant-available phosphorous in soil. *Ecological Engineering*, **25**(1), 51-60.
- Krutz, L. J., Beyrouthy, C. A., Gentry, T. J., Wolf, D. C. & Reynolds, C. M. (2005). Selective enrichment of a pyrene degrader population and enhanced pyrene degradation in *Bermuda* grass rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils*, **41**(5), 359-364.
- Kuiper, I., Kravchenko, L. V., Bloemberg, G. V. & Lugtenberg, B. J. J. (2002). *Pseudomonas putida* Strain PCL1444, Selected for Efficient Root Colonization and Naphthalene Degradation, Effectively Utilizes Root Exudate Components. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **15**(7), 734-741.
- Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Bloemberg, G. V. & Lugtenberg, B. J. J. (2004). Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**(1), 6-15.
- Kumar, S. & Patil, C. B. (2006). Estimation of resource savings due to fly ash utilization in road construction. *Resources, conservation and recycling*, **48**(2), 125-140.
- Kuske, C. R., Ticknor, L. O., Miller, M. E., Dunbar, J. M., Davis, J. A., Barns, S. M. & Belnap, J. (2002). Comparison of Soil Bacterial Communities in Rhizospheres of Three Plant Species and the Interspaces in an Arid Grassland. *Applied Environmental Microbiology*, **68**(4), 1854-1863.

## L

- Lafortune, I., Juteau, P., Déziel, E., Lépine, F., Beaudet, R. & Villemur, R. (2009). Bacterial Diversity of a Consortium Degrading High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in a Two-Liquid Phase Biosystem. *Microbial Ecology*, **57**(3), 455-468.
- Lagrange, H., Jay-Algrange, C. & Lapeyrie, F. (2001). Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytologist*, **149**(2), 349-355.
- Lakay, F. M., Botha, A. & Prior, B. A. (2007). Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *Journal of Applied Microbiology*, **102**(1), 265-273.
- Larkin, M. J., Allen, C. C., Kulakov, L. A. & Lipscomb, D. A. (1999). Purification and characterization of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain NCIMB12038. *Journal of Bacteriology*, **181**(19), 6200-4.
- Lattanzio, V., Cardinali, A., Ruta, C., Fortunato, I. M., Lattanzio, V. M. T., Linsalata, V. & Cicco, N. (2009). Relationship of secondary metabolism to growth in oregano (*Origanum vulgare* L.) shoot cultures under nutritional stress. *Environmental and Experimental Botany*, **65**(1), 54-62.
- Lau, S. S. S., Fang, M. & Wong, J. W. C. (2001). Effects of Composting Process and Fly Ash Amendment on Phytotoxicity of Sewage Sludge. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **40**(2), 184-191.
- Laurie, A. D. & Lloyd-Jones, G. (2000). Quantification of phnAc and nahAc in contaminated new zealand soils by competitive PCR. *Applied Environmental Microbiology*, **66**(5), 1814-7.
- Le Corfec, Y. (2011). Sites et sols pollués - Gestion des passifs environnementaux. *Dunod, Collection "technique et ingénierie"*, 407 pages
- Leckie, J.O. & Benjamin, M.M. (1980). Adsorption/coprecipitation of trace elements from water with iron oxyhydroxide. *Rapport SU - 80-01*, Stanford University, Stanford CA, Etats-Unis, 262 p.
- Lecuyer, L. (1995). Trace-element analysis in fly ash and fly ash leachates: Round-robin test EDF-ENEL. *Fuel and Energy Abstracts*, **36**, 468-468.
- Lee, S.-H., Lee, W.-S., Lee, C.-H. & Kim, J.-G. (2008). Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. *Journal of Hazardous Materials*, **153**(1-2), 892-898.
- Lei, D. & Duan, C. (2008). Restoration potential of pioneer plants growing on lead-zinc mine tailings in Lanping, southwest China. *Journal of Environmental Sciences*, **20**(10), 1202-1209.
- Leigh, M. B., Fletcher, J. S., Fu, X. & Schmitz, F. J. (2002). Root turnover: An important source of microbial substrates in rhizosphere remediation of recalcitrant contaminants. *Environmental Science and Technology*, **36**(7), 1579-83.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C. & Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, **442**(7104), 806-809.
- Leung, H. M., Ye, Z. H. & Wong, M. H. (2007). Survival strategies of plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi on toxic mine tailings. *Chemosphere*, **66**(5), 905-915.

- Leupold, D., Jacob, J., Raab, G., Grimmer, G. & Becker, W. (1992). 091 Induction of cytochrome P450-dependent monooxygenases in the liver of woodmice (*Apodemus sylvaticus*), its influence on the metabolite profiles of PAH and implications for monitoring of environmental xenobiotics. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **343**(1), 149-150.
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J. C., Andersson, B., Basch, G., Christian, D. G., Jorgensen, U., Jones, M. B., Riche, A. B., Schwarz, K. U., Tayebi, K. & Teixeira, F. (2003). Environment and harvest time affects the combustion qualities of *Miscanthus* genotypes. *Agronomy Journal*, **95**(5), 1274-1280.
- Lewandowski, I. & Schmidt, U. (2006). Nitrogen, energy and land use efficiencies of miscanthus, reed canary grass and triticale as determined by the boundary line approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **112**(4), 335-346.
- Lewandowski, I. (1998). Propagation method as an important factor in the growth and development of *Miscanthus×giganteus*. *Industrial Crops and Products*, **8**(3), 229-245.
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J. C., Scurlock, J. M. O. & Huisman, W. (2000). *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass and Bioenergy*, **19**, 209-227.
- Lewandowski, I. & Heinz, A. (2003). Delayed harvest of *Miscanthus* - influences on biomass quantity and quality and environmental impacts of energy production. *European Journal of Agronomy*, **19**(1), 45-63.
- Lewandowski, I. & Schmidt, U. (2006). Nitrogen, energy and land use efficiencies of *Miscanthus*, reed canary grass and triticale as determined by the boundary line approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **112**(4), 335-346.
- Lewandowski, I., Scurlock, J. M. O., Lindvall, E. & Christou, M. (2003). The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy*, **25**(4), 335-361.
- Lewis, D. L., Kollig, H. P. & Hodson, R. E. (1986). Nutrient limitation and adaptation of microbial populations to chemical transformations. *Applied Environmental Microbiology*, **51**(3), 598-603.
- Leys, N. M. E. J., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E. M. & Springael, D. (2004). Occurrence and Phylogenetic Diversity of *Sphingomonas* Strains in Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied Environmental Microbiology*, **70**(4), 1944-1955.
- Leyval, C. & Binet, P. (1998). Effect of polyaromatic hydrocarbons in soil on arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Environmental Quality*, Symposium Agricultural Phosphorous and Eutrophication, Indianapolis, ETATS-UNIS (05/11/1996), **27**(2), 251-317.
- Linde-Laursen, I. (1993). Cytogenetic Analysis of *Miscanthus*'*Giganteus*', an Interspecific Hybrid. *Hereditas*, **119**(3), 297-300.
- Lipponen, M. T. T., Martikainen, P. J., Vasara, R. E., Servomaa, K., Zacheus, O. & Kontro, M. H. (2004). Occurrence of nitrifiers and diversity of ammonia-oxidizing bacteria in developing drinking water biofilms. *Water Research*, **38**(20), 4424-4434.
- Liste, H. H. & Alexander, M. (2000). Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil. *Chemosphere*, **40**(1), 11-14.
- Liu, D., Maguire, R. J., Pacepavicius, G. J. & Nagy, E. (1992). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic nitrogen heterocyclics. *Environmental Toxicology and Water Quality*, **7**(4), 355-372.
- Lloyd-Jones, G., Laurie, A. D., Hunter, D. W. & Fraser, R. (1999). Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils. *FEMS Microbiology Ecology*, **29**(1), 69-79.
- Loi n° 75-633 du 15 juillet 1975. Loi n° 75-633 du 15 juillet 1975 relative à l'élimination des déchets et à la récupération des matériaux modifiée (Titre IV Déchets - art. L541-1 et suivants du code de l'environnement - Partie législative).
- Loi n° 76-663 du 19 juillet 1976. Loi n° 76-663 du 19 juillet 1976 relative aux installations classées pour la protection de l'environnement (Livre V Prévention des pollutions, des risques et des nuisances - Titre I Installations classées pour la protection de l'environnement - art. L511-1 et suivants du code de l'environnement - Partie législative).
- Long, S. P. (1983). C<sub>4</sub> photosynthesis at low temperatures. *Plant, Cell & Environment*, **6**(4), 345-363.
- Lundstedt, S., White, P. A., Lemieux, C. L., Lynes, K. D., Lambert, I. B., Åberg, L., Haglund, P. & Tysklind, M. (2007). Sources, Fate, and Toxic Hazards of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated Sites. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, **36**(6), 475-485.
- Luthy, R. G., Aiken, G. R., Brusseu, M. L., Cunningham, S. D., Gschwend, P. M., Pignatello, J. J., Reinhard, M., Traina, S. J., Weber, W. J. & Westall, J. C. (1997). Sequestration of Hydrophobic Organic Contaminants by Geosorbents. *Environmental Science & Technology*, **31**(12), 3341-3347.

# M

- Ma, B., He, Y., Chen, H.-h., Xu, J.-m. & Rengel, Z. (2010a). Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the rhizosphere: Synthesis through meta-analysis. *Environmental Pollution*, **158**(3), 855-861.
- Ma, B., Chen, H., Xu, M., Hayat, T., He, Y. & Xu, J. (2010b). Quantitative structure-activity relationship (QSAR) models for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) dissipation in rhizosphere based on molecular structure and effect size. *Environmental Pollution*, **158**(8), 2773-2777.
- Macek, T., Macková, M. & Kás, J. (2000). Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances*, **18**(1), 23-34.
- Machulla, G., Zikeli, S., Kastler, M. & Jahn, R. (2004). Microbial biomass and respiration in soils derived from lignite ashes: a profile study. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **167**(4), 449-456.
- Mackay, D. & Wania, F. (1995). Transport of contaminants to the Arctic: partitioning, processes and models. *Science of The Total Environment*, **160-161**, 25-38.
- MacLean, A. M., MacPherson, G., Aneja, P. & Finan, T. M. (2006). Characterization of the {beta}-Ketoacid Pathway in *Sinorhizobium meliloti*. *Applied Environmental Microbiology*, **72**(8), 5403-5413.
- MacLeod, C. J. A. & Semple, K. T. (2000). Influence of Contact Time on Extractability and Degradation of Pyrene in Soils. *Environmental Science & Technology*, **34**(23), 4952-4957.
- MacLeod, C. T. & Daugulis, A. J. (2005). Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a hydrophobic *Mycobacterium*. *Process Biochemistry*, **40**(5), 1799-1805.
- Madsen, T. & Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and nonionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environmental toxicology and chemistry*, **16**(4), 631-637.
- Mahjoub, B., Jayr, E., Bayard, R. & Gourdon, R. (2000). Phase partition of organic pollutants between coal tar and water under variable experimental conditions. *Water Research*, **34**(14), 3551-3560.
- Maila, M. P. & Cloete, T. E. (2002). Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **50**(2), 107-113.
- Maliszewska-Kordybach, B., Klimkiewicz-Pawlas, A., Smreczak, B. & Janusauskaite, D. (2007). Ecotoxic effect of phenanthrene on nitrifying bacteria in soils of different properties. *Journal of Environmental Quality*, **36**(6), 1635-1645.
- Mallakin, A., Babu, T. S., Dixon, D. G. & Greenberg, B. M. (2002). Sites of toxicity of specific photooxidation products of anthracene to higher plants: Inhibition of photosynthetic activity and electron transport in *Lemna gibba* L. G-3 (Duckweed). *Environmental Toxicology*, **17**(5), 462-471.
- Manilal, V. B. & Alexander, M. (1991). Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **35**(3), 401-405.
- Manome, A., Zhang, H., Tani, Y., Katsuragi, T., Kurane, R. & Tsuchida, T. (2001). Application of gel microdroplet and flow cytometry techniques to selective enrichment of non-growing bacterial cells. *FEMS Microbiology Letters*, **197**(1), 29-33.
- Manz, O. E. (1999). Coal fly ash: a retrospective and future look. *Fuel*, **78**(2), 133-136.
- Margesin, R., Zimmerbauer, A. & Schinner, F. (2000). Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, **40**(4), 339-346.
- Marschner, H., Romheld, V., Horst, W. J. & Martin, P. (1986). Root-induced changes in the rhizosphere: importance for the mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **149**(4), 441-456.
- Marschner, P., Neumann, G., Kania, A., Weiskopf, L. & Lieberei, R. (2002). Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant and Soil*, **246**(2), 167-174.
- Marshall, A. T., Haverkamp, R. G., Davies, C. E., Parsons, J. G., Gardea-Torresdey, J. L. & van Agterveld, D. (2007). Accumulation of Gold Nanoparticles in *Brassic Juncea*. *International Journal of Phytoremediation*, **9**(3), 197 - 206.
- Martínez, C. E. & Motto, H. L. (2000). Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environmental Pollution*, **107**(1), 153-158.
- Marx, R. B. & Aitken, M. D. (1999). Quantification of Chemotaxis to Naphthalene by *Pseudomonas putida* G7. *Applied Environmental Microbiology*, **65**(7), 2847-2852.
- Matsuo, Y. (2002). Formation of Schiff Bases of Pyridoxal Phosphate. Reaction with Metal Ions1. *Journal of the American Chemical Society*, **79**(8), 2011-2015.
- Matzke, A. J. M. & Matzke, M. A. (1998). Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology*, **1**(2), 142-148.
- Mayr, C., Winding, A. & Hendriksen, N. B. (1999). Community level physiological profile of soil bacteria unaffected by extraction method. *Journal of Microbiological Methods*, **36**(1-2), 29-33.

- McFall, S. M., Abraham, B., Narsolis, C. G. & Chakrabarty, A. M. (1997). A tricarboxylic acid cycle intermediate regulating transcription of a chloroaromatic biodegradative pathway: fumarate-mediated repression of the *clcABD* operon. *Journal of Bacteriology*, **179**(21), 6729-6735.
- McFall, S. M., Chugani, S. A. & Chakrabarty, A. M. (1998). Transcriptional activation of the catechol and chlorocatechol operons: variations on a theme. *Gene*, **223**(1-2), 257-267.
- McLntyre, T. & Lewis, G. M. (1997). The advancement of phytoremediation as an innovative environmental technology for stabilization, remediation, or restoration of contaminated sites in Canada: A discussion paper. *Journal of Soil Contamination*, **6**(3), 227 - 241.
- McNally, D. L., Mihelcic, J. R. & Lueking, D. R. (1999). Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions. *Chemosphere*, **38**(6), 1313-1321.
- MEDD Note ministérielle. (2007). Note ministérielle du 8 février 2007 relative aux modalités de gestion et de réaménagement des sites pollués. Annexe 2, Comment identifier un site (potentiellement) pollué – Comment gérer un problème de site pollué – Modalités de gestion et de réaménagement des sites pollués
- Meharg, A. A. & Cairney, J. W. G. (2000). Ectomycorrhizas - extending the capabilities of rhizosphere remediation? *Soil Biology and Biochemistry*, **32**(11-12), 1475-1484.
- Meinschein, W. G. (1961). Significance of hydrocarbons in sediments and petroleum. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **22**(1), 58-64.
- Menezes Bento, F., de Oliveira Camargo, F. A., Okeke, B. C. & Frankenberger, J. W. T. (2005). Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiological Research*, **160**(3), 249-255.
- Meulenberg, R., Rijnaarts, H. H., Doddema, H. J. & Field, J. A. (1997). Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS Microbiology Letters*, **152**(1), 45-49.
- Michel, R., Gruber, R., Burg, P., Rapagnà, S., Celso, G. M. D. & Courson, C. (2007). Gasification of *Miscanthus X Giganteus* in Catalytic Conditions: Production of Syngas, Preliminary Results. *ARCUS SubProject 4 - Environment. Natural resources, Names 2007 3rd France-Russia Seminar*, pp. 99-102.
- Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L. & Ghiorse, W. C. (1999). Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Applied Environmental Microbiology*, **65**(11), 4715-4724.
- Miller, K. P. & Ramos, K. S. (2001). Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metabolism Reviews*, **33**(1), 1-35.
- Mishra, L. C. & Shukla, K. N. (1986). Edaphic properties of fly ash from A coal-fired power plant at Kanpur, India. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, **11**(1), 55-66.
- Mishra, L. C. & Shukla, K. N. (1986). Effects of fly ash deposition on growth, metabolism and dry matter production of maize and soybean. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, **42**(1), 1-13.
- Mitrovic, M., Pavlovic, P., Lakusic, D., Djurdjevic, L., Stevanovic, B., Kostic, O. & Gajic, G. (2008). The potential of *Festuca rubra* and *Calamagrostis epigejos* for the revegetation of fly ash deposits. *Science of The Total Environment*, **407**(1), 338-347.
- Miya, R. K. & Firestone, M. K. (2000). Phenanthrene-degrader community dynamics in rhizosphere soil from a common annual grass. *Journal of Environmental Quality*, **29**(2), 584-592.
- Miya, R. K. & Firestone, M. K. (2001). Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender oat root exudates and root debris. *Journal of Environmental Quality*, **30**(6), 1911-1918.
- Miyamoto, T., Kawahara, M. & Minamisawa, K. (2004). Novel Endophytic Nitrogen-Fixing *Clostridia* from the Grass *Miscanthus sinensis* as Revealed by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Applied Environmental Microbiology*, **70**(11), 6580-6586.
- Mohammadi, H.S., Omidinia, E., Lotfi, A.S. & Saghiri, R. (2007). Preliminary Report of NAD<sup>+</sup>-Dependent Amino Acid Dehydrogenase Producing Bacteria Isolated from Soil. *Iranian Biomedical Journal*, **11**(2), 131-135.
- Mølbak, L., Molin, S. & Kroer, N. (2007). Root growth and exudate production define the frequency of horizontal plasmid transfer in the Rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, **59**(1), 167-176.
- Möller, R., Toonen, M., van Beilen, J., Salentijn, E. & Clayton, D. (2007). Crop platforms for cell wall biorefining: lignocellulose feedstocks *EPOBIO: Realising the Economic Potential of Sustainable Resources - Bioproducts from Non-food Crops*.
- Momma, K., Hashimoto, W., Miyake, O., Yoon, H. J., Kawai, S., Mishima, Y., Mikami, B. & Murata, K. (1999). Special cell surface structure, and novel macromolecule transport/depolymerization system of *Sphingomonas* sp A1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **23**(4-5), 425-435.

- Monferrer-Pons, L., Capella-Peiró, M. E., Gil-Agustí, M. & Esteve-Romero, J. (2003). Micellar liquid chromatography determination of B vitamins with direct injection and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*, **984**(2), 223-231.
- Moody, J. D., Freeman, J. P., Doerge, D. R. & Cerniglia, C. E. (2001). Degradation of Phenanthrene and Anthracene by Cell Suspensions of *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. *Applied Environmental Microbiology*, **67**(4), 1476-1483.
- Moreira, D. (1998). Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Res*, **26**(13), 3309-10.
- Mueller, J. G., Devereux, R., Santavy, D. L., Lantz, S. E., Willis, S. G. & Pritchard, P. H. (1997). Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Antonie van Leeuwenhoek*, **71**(4), 329-343.
- Mueller, K. E. & Shann, J. R. (2006). PAH dissipation in spiked soil: Impacts of bioavailability, microbial activity, and trees. *Chemosphere*, **64**(6), 1006-1014.
- Mukamolova, G. V., Kaprelyants, A. S., Young, D. I., Young, M. & Kell, D. B. (1998). A bacterial cytokine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(15), 8916-8921.
- Mukerji, K., Manoharachary, C., Singh, J., Singh, G. & Mukerji, K. (2006). Root Exudates as Determinant of Rhizospheric Microbial Biodiversity. *Microbial Activity in the Rhizosphere*, **7**, 39-53.
- Muller, C., Petruschka, L., Cuypers, H., Burchhardt, G. & Herrmann, H. (1996). Carbon catabolite repression of phenol degradation in *Pseudomonas putida* is mediated by the inhibition of the activator protein PhIR. *Journal of Bacteriology*, **178**(7), 2030-2036.
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, **133**(2), 183-198.
- Muratova, A., Bner, T., Narula, N., Wand, H., Turkovskaya, O., Kusch, P., Jahn, R. & Merbach, W. (2003). Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Microbiological research*, **158**(2), 151-161.
- Muratova, A., Golubev, S., Wittenmayer, L., Dmitrieva, T., Bondarenkova, A., Hirche, F., Merbach, W. & Turkovskaya, O. (2009). Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene on root exudation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Environmental and Experimental Botany*, **66**(3), 514-521.
- Murphy, E. M., Zachara, J. M., Smith, S. C., Phillips, J. L. & Wietsma, T. W. (1994). Interaction of Hydrophobic Organic Compounds with Mineral-Bound Humic Substances. *Environmental Science & Technology*, **28**(7), 1291-1299.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, **59**(3), 695-700.

## N

- Naidu, R. (2003). Treatment of Contaminated Soil: Fundamentals, Analysis, Applications., *Geoderma*, **111**(1-2), 151-153.
- Naidu, S. L., Moose, S. P., Al-Shoaibi, A. K., Raines, C. A. & Long, S. P. (2003). Cold Tolerance of C<sub>4</sub> photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*: Adaptation in Amounts and Sequence of C<sub>4</sub> Photosynthetic Enzymes. *Plant Physiology*, **132**(3), 1688-1697.
- Nam, K. & Alexander, M. (1998). Role of nanoporosity and hydrophobicity in sequestration and bioavailability: Tests with model solids. *Environmental science & technology*, **32**(1), 71-74.
- Nam, K., Chung, N. & Alexander, M. (1998). Relationship between Organic Matter Content of Soil and the Sequestration of Phenanthrene. *Environmental Science & Technology*, **32**(23), 3785-3788.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. & Valori, F. (2007). Microbial diversity and microbial activity in the rhizosphere. *Ciencia del suelo*, **25**, 89-97.
- Nannipieri, P., Smalla, K., Krsek, M., Gaze, W. H., Morris, N. Z. & Wellington, E. M. H. (2006). Gene Detection, Expression and Related Enzyme Activity in Soil. *Nucleic Acids and Proteins in Soil*, **8**, 217-255.
- Napoli, C., Mello, A. & Bonfante, P. (2008). Dissecting the Rhizosphere complexity: The truffle-ground study case. *Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Rendiconti Lincei. Scienze fisiche e naturali*, **19**(3), 241-259.
- Narasimhan, K., Basheer, C., Bajic, V. B. & Swarup, S. (2003). Enhancement of Plant-Microbe Interactions Using a Rhizosphere Metabolomics-Driven Approach and Its Application in the Removal of Polychlorinated Biphenyls. *Plant Physiology*, **132**(1), 146-153.
- Neff, J. M., Stout, S. A. & Gunster, D. G. (2005). Ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: Identifying sources and ecological hazard. *Integrated Environmental Assessment and Management*, **1**(1), 22-33.

- Neukirchen, D., Himken, M., Lammel, J., Czipionka-Krause, U. & Olf, H. W. (1999). Spatial and temporal distribution of the root system and root nutrient content of an established *Miscanthus* crop. *European Journal of Agronomy*, **11**(3-4), 301-309.
- Neumann, G. & Römheld, V. (1999). Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil*, **211**(1), 121-130.
- Neumann, G. & Römheld, V. (2000). The release of root exudates as affected by the plant physiological status. *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, Marcel Dekker, 79 pp.
- Newman, L. A., Doty, S. L., Gery, K. L., Heilman, P. E., Muiznieks, I., Shang, T. Q., Siemieniec, S. T., Strand, S. E., Wang, X., Wilson, A. M. & Gordon, M. P. (1998). Phytoremediation of Organic Contaminants: A Review of Phytoremediation Research at the University of Washington. *Journal of Soil Contamination*, **7**(4), 531-542.
- NF T 90-375. (1998). Détermination de l'inhibition de croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata*.
- NF ISO 11261. (1995). Azote total méthode Kjeldhal. .
- NF ISO 11466. (1995). X31-415, Extraction des éléments traces solubles dans l'eau régale.
- NF X 31-100. (1992). Qualité des sols – échantillonnage – Méthode de prélèvement d'échantillons de sols
- NF X 31-109. (1993). Détermination du carbone organique total par méthode ANNE NF X 31-109.
- Nguyen, C. (2003). Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie*, **23**(5-6), 375-396.
- Nichols, D. (2007). Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiology Ecology*, **60**(3), 351-357.
- Nichols, T., Wolf, D., Rogers, H., Beyrouy, C. & Reynolds, C. (1997). Rhizosphere microbial populations in contaminated soils. *Water, Air & Soil Pollution*, **95**(1), 165-178.
- Nicol, G. W., Glover, L. A. & Prosser, J. I. (2003). Spatial Analysis of Archaeal Community Structure in Grassland Soil. *Applied Environmental Microbiology*, **69**(12), 7420-7429.
- Nielsen, K. M. & van Elsas, J. D. (2001). Stimulatory effects of compounds present in the rhizosphere on natural transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**(3), 345-357.
- Nielsen, M. N. & Winding, A. (2002). Microorganisms as Indicators of Soil Health (National Environmental Research Institute, Denmark).
- Nirmala, E., Remesh, K. N. & Nair, S. R. (1995). Effect of aluminium on cow pea (*Vigna sinensis* L. CV. Kanakamony). *International journal of environmental studies*, **49**(2), 117-123.
- Nojiri, H., Shintani, M. & Omori, T. (2004). Divergence of mobile genetic elements involved in the distribution of xenobiotic-catabolic capacity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **64**(2), 154-174.
- Nsemi Muanda, F., Dicko, A. & Soulimani, R. (2010). Assessment of polyphenolic compounds, in vitro antioxidant and anti-inflammation properties of *Securidaca longepedunculata* root barks. *Comptes Rendus Biologies*, **333**(9), 663-669.

## O

- OCDE. (2001). Révision de la décisionV(92)39/FINAL sur le contrôle des mouvements transfrontaliers de déchets destinés à des opérations de valorisation. *Organisation de Coopération et de Développement Economiques Organisation for Economic Co-operation and Development (OCDE)*, [C/M(2002)4].
- OECD, 1995 OECD, 1995. Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments. Belgirate, Italy, Technical Report No. 338, 15 pp.
- Oggiano, N., Angelini, L. G. & Cappelletto, P. (1997). Pulping and paper properties of some fibre crops. *Industrial Crops and Products*, **7**(1), 59-67.
- Olson, P., Flechter, J. & Philp, P. (2001). Natural attenuation/phytoremediation in the vadose zone of a former industrial sludge basin. *Environmental Science and Pollution Research*, **8**(4), 243-249.
- Olson, P. E., Castro, A., Joern, M., DuTeau, N. M., Pilon-Smits, E. & Reardon, K. F. (2008). Effects of Agronomic Practices on Phytoremediation of an Aged PAH-Contaminated Soil. *Journal of Environmental Quality*, **37**(4), 1439-1446.
- Olson, P. E. & Fletcher, J. S. (1999). Field Evaluation of Mulberry Root Structure with Regard to Phytoremediation. *Bioremediation Journal*, **3**(1), 27 - 34.
- Ortega-Calvo, J. J., Marchenko, A. I., Vorobyov, A. V. & Borovick, R. V. (2003). Chemotaxis in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from coal-tar- and oil-polluted rhizospheres. *FEMS microbiology ecology*, **44**(3), 373-381.
- Otten, W. (2008). Modern Soil Microbiology. 2nd edition. Edited by J. D. van Elsas, J. K. Jansson, and J. T. Trevors. Boca Raton, FL, USA: CRC Press/Taylor and Francis Group (2007), 646 p, ISBN-10:0-8247-2749-5, *Experimental Agriculture*, **44**(01), 133-133.

Owabor, C. N. & Ogunbor, O. F. (2007). Naphthalene and pyrene degradation in contaminated soil as a function of the variation of particle size and percent organic matter. *African Journal of Biotechnology*, **6**(4), 436-440.

## P

- Paasivirta, J., Sinkkonen, S., Mikkelsen, P., Rantio, T. & Wania, F. (1999). Estimation of vapor pressures, solubilities and Henry's law constants of selected persistent organic pollutants as functions of temperature. *Chemosphere*, **39**(5), 811-832.
- Pagnout, C., Rast, C., Veber, A.-M., Poupin, P. & Férard, J.-F. (2006). Ecotoxicological assessment of PAHs and their dead-end metabolites after degradation by *Mycobacterium* sp. strain SNP11. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **65**(2), 151-158.
- Pahlman, R. & Pelkonen, O. (1987). Mutagenicity studies of different polycyclic aromatic hydrocarbons: the significance of enzymatic factors and molecular structure. *Carcinogenesis*, **8**(6), 773-778.
- Pandey, V. C., Abhilash, P. C. & Singh, N. (2009). The Indian perspective of utilizing fly ash in phytoremediation, phytomanagement and biomass production. *Journal of Environmental Management*, **90**(10), 2943-2958.
- Parrish, Z. D., Banks, M. K. & Schwab, A. P. (2005). Assessment of contaminant lability during phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon impacted soil. *Environmental Pollution*, **137**(2), 187-197.
- Peng, J.-J., Cai, C., Qiao, M., Li, H. & Zhu, Y.-G. (2010). Dynamic changes in functional gene copy numbers and microbial communities during degradation of pyrene in soils. *Environmental Pollution*, **158**(9), 2872-2879.
- Peng, R. H., Xiong, A. S., Xue, Y., Fu, X. Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y. S. & Yao, Q. H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, **32**(6), 927-955.
- Penning, T. M., Burczynski, M. E., Hung, C.-F., McCoull, K. D., Palackal, N. T. & Tsuruda, L. S. (1998). Dihydrodiol Dehydrogenases and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Activation Generation of Reactive and Redox Active o-Quinones. *Chemical Research in Toxicology*, **12**(1), 1-18.
- Penny, C., Nadalig, T., Alioua, M., Gruffaz, C., Vuilleumier, S. & Bringel, F. (2009). Coupling of D-HPLC and T-RFLP with precise fragment size calling for microbial community profiling and characterization. *Applied Environmental Microbiology*, **76**(3), 648-651.
- Perry, J. J. (1979). Microbial cooxidations involving hydrocarbons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **43**(1), 59-72.
- Persoh, D., Theuerl, S., Buscot, F. & Rambold, G. (2008). Towards a universally adaptable method for quantitative extraction of high-purity nucleic acids from soil. *Journal of Microbiological Methods*, **75**(1), 19-24.
- Peters, Z. J., Nykamp, J. A., Passaperuma, K., Carlson, J. C., Dewitte-Orr, S. J., Greenberg, B. M. & Bols, N. C. (2007). Effect of copper on the cytotoxicity of phenanthrene and 9,10-phenanthrenequinone to the human placental cell line. *Reproductive toxicology*, **23**(4), 513-520.
- Phillips, L. A., Greer, C. W. & Germida, J. J. (2006). Culture-based and culture-independent assessment of the impact of mixed and single plant treatments on rhizosphere microbial communities in hydrocarbon contaminated flare-pit soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**(9), 2823-2833.
- Phillips, L. A. (2008). The relationship between plants and their root-associated microbial communities in hydrocarbon phytoremediation systems; University of Saskatchewan, Department of Soil Science, Saskatoon. *Thesis*.
- Phillips, L. A., Germida, J. J., Farrell, R. E. & Greer, C. W. (2008). Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**(12), 3054-3064.
- Phillips, R. P., Bernhardt, E. S. & Schlesinger, W. H. (2009). Elevated CO<sub>2</sub> increases root exudation from loblolly pine (*Pinus taeda*) seedlings as an N-mediated response. *Tree Physiology*, **29**(12), 1513-1523.
- Pearce, T. G., Langdon, C. J., Meharg, A. A. & Semple, K. T. (2002). Yellow earthworms: distinctive pigmentation associated with arsenic- and copper-tolerance in *Lumbricus rubellus*. *Soil biology & biochemistry*, **34**(12), 1833-1838.
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, **56**(1), 15-39.
- Pilon-Smits, E. A. H. & Freeman, J. L. (2006). Environmental cleanup using plants: biotechnological advances and ecological considerations. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **4**(4), 203-210.
- Pineda, A., Zheng, S.-J., van Loon, J. J. A., Pieterse, C. M. J. & Dicke, M. (2010). Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends in Plant Science*, **15**(9), 507-514.

- Ping, L., Luo, Y., Wu, L., Qian, W., Song, J. & Christie, P. (2006). Phenanthrene adsorption by soils treated with humic substances under different pH and temperature conditions. *Environmental Geochemistry and Health*, **28**(1), 189-195.
- Powell, S. N., Singleton, D. R. & Aitken, M. D. (2008). Effects of Enrichment with Salicylate on Bacterial Selection and PAH Mineralization in a Microbial Community from a Bioreactor Treating Contaminated Soil. *Environmental Science & Technology*, **42**(11), 4099-4105.
- Punshon, T., Adriano, D. C. & Weber, J. T. (2002). Restoration of drastically eroded land using coal fly ash and poultry biosolid. *The Science of The Total Environment*, **296**(1-3), 209-225.
- Putrins, M., Tover, A., Tegova, R., Saks, U. & Kivisaar, M. (2007). Study of factors which negatively affect expression of the phenol degradation operon pheBA in *Pseudomonas putida*. *Microbiology*, **153**(6), 1860-1871.
- Pyter, R., Heaton, E., Dohleman, F., Voigt, T. & Long, S. (2009). Agronomic Experiences with *Miscanthus x giganteus* in Illinois, USA, **581**, 41-52.
- Pyter, R. J., Dohleman, F. G. & Voigt, T. B. (2010). Effects of rhizome size, depth of planting and cold storage on *Miscanthus x giganteus* establishment in the Midwestern USA. *Biomass and Bioenergy*, **34**(10), 1466-1470.

## Q

- Qiu, X., Leland Thomas, W., Shah Sunil, I., Sorensen Darwin, L. & Kendall Ernest, W. (1997). Field Study: Grass Remediation for Clay Soil Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, **664**, 186-199.
- Qiu, X., Reed, B. E. & Viadero, R. C. (2004). Effects of Flavonoids on <sup>14</sup>C[7,10]-Benzo[a]pyrene Degradation in Root Zone Soil. *Environmental Engineering Science*, **21**(5), 637-646.
- Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Lanz, C., Schuster, S. C., Treusch, A. H., Eck, J. & Schleper, C. (2003). Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Molecular Microbiology*, **50**(2), 563-575.
- Querol, X., Umaña, J. C., Alastuey, A., Ayora, C., Lopez-Soler, A. & Plana, F. (2001). Extraction of soluble major and trace elements from fly ash in open and closed leaching systems. *Fuel*, **80**(6), 801-813.

## R

- Raber, B. & Kögel-Knabner, I. (1997). Influence of origin and properties of dissolved organic matter on the partition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *European Journal of Soil Science*, **48**(3), 443-455.
- Rajendhran, J. & Gunasekaran, P. (2008). Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnology Advances*, **26**(6), 576-590.
- Ram, L. C. & Mastro, R. E. (2010). An appraisal of the potential use of fly ash for reclaiming coal mine spoil. *Journal of Environmental Management*, **91**(3), 603-617.
- Ram, L. C., Srivastava, N. K., Tripathi, R. C., Jha, S. K., Sinha, A. K., Singh, G. & Manoharan, V. (2006). Management of mine spoil for crop productivity with lignite fly ash and biological amendments. *Journal of Environmental Management*, **79**(2), 173-187.
- Rappé, M. S. & Giovannoni, S. J. (2003). The Uncultured Microbial Majority. *Annual Review of Microbiology*, **57**(1), 369-394.
- Rapport ANTEA n° A 04542. EDF – Centrale thermique de Richemont (57), Diagnostic de la qualité des sols et des eaux au droit du site.
- Rees, W. J. & Sidrak, G. H. (1956). Plant nutrition on fly-ash. *Plant and Soil*, **8**(2), 141-159.
- Rehmann, L., Prpich, G. P. & Daugulis, A. J. (2008). Remediation of PAH contaminated soils: Application of a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor. *Chemosphere*, **73**(5), 798-804.
- Reid, B. J., Stokes, J. D., Jones, K. C. & Semple, K. T. (2000). Nonexhaustive Cyclodextrin-Based Extraction Technique for the Evaluation of PAH Bioavailability. *Environmental Science & Technology*, **34**(15), 3174-3179.
- Reilley, K. A., Banks, M. K. & Schwab, A. P. (1996). Dissipation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Rhizosphere. *Journal of Environmental Quality*, **25**(2), 212-219.
- Rennie, R. J. & Kemp, G. A. (1981). Selection for dinitrogen-fixing ability in *Phaseolus vulgaris* L. at two low-temperature regimes. *Euphytica*, **30**(1), 87-95.
- Rentz, Jeremy, A., Alvarez, Pedro, J. J., Schnoor & Jerald, L. (2008). Benzo[a]pyrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02. *Environmental Pollution*, **151**(3), 669-677.

- Rentz, J. A., Alvarez, P. J. J. & Schnoor, J. L. (2005). Benzo[a]pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: Implications for phytoremediation. *Environmental Pollution*, **136**(3), 477-484.
- Rentz, J. A., Alvarez, P. J. J. & Schnoor, J. L. (2004). Repression of *Pseudomonas putida* phenanthrene-degrading activity by plant root extracts and exudates. *Environmental Microbiology*, **6**(6), 574-583.
- Resnick, S. M., Lee, K. & Gibson, D. T. (1996). Diverse reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp strain NCIB 9816. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **17**(5), 438-457.
- Reynaud, S. & Deschaux, P. (2006). The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquatic Toxicology*, **77**(2), 229-238.
- Richter, H. & Howard, J. B. (2000). Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their growth to soot - a review of chemical reaction pathways. *Progress in Energy and Combustion Science*, **26**(4-6), 565-608.
- Ríha, V., Nymburská, K., Tichý, R. & Tríska, J. (1993). Microbiological, chemical and toxicological characterization of contaminated sites in Czechoslovakia. *Science of The Total Environment*, **134**(Supplement 1), 185-193.
- Rivas, J., Gimeno, O., De La Calle, R. G., Portela, J. R. & De La Ossa, E. M. (2009). Remediation of PAH spiked soils: Concentrated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment/continuous hot water extraction-oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, **168** (2-3), 1359-1365.
- Rochelle, D. H., Stephen, I. N. E., Daniel, E. D., Huey-Min, H. & Lynette, E. (2005). *Bacillus subtilis* is a Potential Degradator of Pyrene and Benzo[a]pyrene. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **2**(2), 267-271.
- Rockne, K. J. & Strand, S. E. (1998). Biodegradation of Bicyclic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Anaerobic Enrichments. *Environmental Science & Technology*, **32**(24), 3962-3967.
- Rojo, F. (2010). Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiology Reviews*, **34**(5), 658-684.
- Romantschuk, M., Sarand, I., Petänen, T., Peltola, R., Jonsson-Vihanne, M., Koivula, T., Yrjälä, K. & Haahtela, K. (2000). Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. *Environmental Pollution*, **107**(2), 179-185.
- Römheld, V. (1987). Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiologia Plantarum*, **70**(2), 231-234.
- Romine, M. F., Stillwell, L. C., Wong, K.-K., Thurston, S. J., Sisk, E. C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J. K. & Saffer, J. D. (1999). Complete Sequence of a 184-Kilobase Catabolic Plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *Journal of Bacteriology*, **181**(5), 1585-1602.
- Ronchel, M. C. & Ramos, J. L. (2001). Dual system to reinforce biological containment of recombinant bacteria designed for rhizoremediation. *Applied Environmental Microbiology*, **67**(6), 2649-56.
- Roose-Amsaleg, C. L., Garnier-Sillam, E. & Harry, M. (2001). Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology*, **18**(1), 47-60.
- Rovira, A. D. (1959). Root excretions in relation to the rhizosphere effect. *Plant and Soil*, **11**(1), 53-64.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J. & Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, **278**(1), 1-9.

## S

- Sabaté, J., Viñas, M. & Solanas, A. M. (2004). Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **54**(1), 19-25.
- Sack, U. & Fritsche, W. (1997). Enhancement of pyrene mineralization in soil by wood-decaying fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, **22**(1), 77-83.
- Sack, U. & Günther, T. (1993). Metabolism of PAH by fungi and correlation with extracellular enzymatic activities. *Journal of Basic Microbiology*, **33**(4), 269-277.
- Sadasivan, S. & Negi, B. S. (1991). Chemical characterisation of fly ash from coal-fired thermal power plants in India. *The Science of The Total Environment*, **103**(2-3), 151-158.
- Safonova, E., Kvitko, K., Kuschik, P., Moder, M. & Reisser, W. (2005). Biodegradation of phenanthrene by the green alga *Scenedesmus obliquus* ES-55. *Engineering in life sciences*, **5**(3), 234-239.
- Sagova-Mareckova, M., Cermak, L., Novotna, J., Plhachova, K., Forstova, J. & Kopecky, J. (2008). Innovative Methods for Soil DNA Purification Tested in Soils of Widely Differing Characteristics. *Applied Environmental Microbiology, Applied and Environmental Microbiology*, **74**(9), 2902-2907.
- Saison, C., Perrin-Ganier, C., Schiavon, M. & Morel, J.-L. (2004). Effect of cropping and tillage on the dissipation of PAH contamination in soil. *Environmental Pollution*, **130**(2), 275-285.
- Saito, A., Iwabuchi, T. & Harayama, S. (1999). Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides* sp. KP7. *Chemosphere*, **38**(6), 1331-1337.

- Saiz, E., Movilla, J., Yebra, L., Barata, C. & Calbet, A. (2009). Lethal and sublethal effects of naphthalene and 1,2-dimethylnaphthalene on naupliar and adult stages of the marine cyclopoid copepod *Oithona davisae*. *Environmental Pollution*, **157**(4), 1219-1226.
- Sakamoto, C., Yamaguchi, N. & Nasu, M. (2005). Rapid and Simple Quantification of Bacterial Cells by Using a Microfluidic Device. *Applied Environmental Microbiology*, **71**(2), 1117-1121.
- Salama, N., Guillemin, K., McDaniel, T. K., Sherlock, G., Tompkins, L. & Falkow, S. (2000). A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**(26), 14668-14673.
- Salanitro, J. P., Dorn, P. B., Huesemann, M. H., Moore, K. O., Rhodes, I. A., Jackson, L. M. R., Vipond, T. E., Western, M. M. & Wisniewski H. L. (1997). Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental science & technology*, **31**(6), 1769-1776.
- Samanta, S. K., Singh, O. V. & Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, **20**(6), 243-248.
- Santhosh, S. R., Parida, M. M., Dash, P. K., Pateriya, A., Pattnaik, B., Pradhan, H. K., Tripathi, N. K., Ambuj, S., Gupta, N., Saxena, P. & Lakshmana Rao, P. V. (2007). Development and evaluation of SYBR Green I-based one-step real-time RT-PCR assay for detection and quantitation of Japanese encephalitis virus. *Journal of Virological Methods*, **143**(1), 73-80.
- Sarkar, A. & Rano, R. (2007). Water Holding Capacities of Fly Ashes: Effect of Size Fractionation. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, **29**(5), 471 - 482.
- Savka, M. A. & Farrand, S. K. (1997). Modification of rhizobacterial populations by engineering bacterium utilization of a novel plant-produced resource. *Nature Biotechnology*, **15**(4), 363-368.
- Schaetzl, R. J. & Anderson, S. (2006). Soils: Genesis and Geomorphology Reviewed by Joseph A. Mason. *Annals of the Association of American Geographers*, **96**(4), 827-828.
- Schindelbeck, R. R., van Es, H. M., Abawi, G. S., Wolfe, D. W., Whitlow, T. L., Gugino, B. K., Idowu, O. J. & Moebius-Clune, B. N. (2008). Comprehensive assessment of soil quality for landscape and urban management. *Landscape and Urban Planning*, **88**(2-4), 73-80.
- Schnoor, J. L., Light, L. A., McCutcheon, S. C., Wolfe, N. L. & Carreia, L. H. (1995). Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science & Technology*, **29**(7), 318A-323A.
- Schobert, C., Köckenberger, W. & Komor, E. (1988). Uptake of amino acids by plants from the soil: A comparative study with castor bean seedlings grown under natural and axenic soil conditions. *Plant and Soil*, **109**(2), 181-188.
- Schramke, J. A. (1992). Neutralization of alkaline coal fly ash leachates by CO<sub>2</sub> (g). *Applied Geochemistry*, **7**(5), 481-492.
- Schutter, M. E. & Fuhrmann, J. J. (2001). Soil microbial community responses to fly ash amendment as revealed by analyses of whole soils and bacterial isolates. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**(14), 1947-1958.
- Schwab, A. P., Al-Assi, A. A. & Banks, M. K. (1998). Adsorption of naphthalene onto plant roots. *Journal of environmental quality*, **27**(1), 220-224.
- Schwarz, H., Liebhard, P., Ehrendorfer, K. & Ruckebauer, P. (1994). The effect of fertilization on yield and quality of *Miscanthus sinensis* "Giganteus". *Industrial Crops and Products*, **2**(3), 153-159.
- Schwitzguébel, J.-P., van der Lelie, D., Baker, A., Glass, D. & Vangronsveld, J. (2002). Phytoremediation: European and American trends successes, obstacles and needs. *Journal of Soils and Sediments*, **2**(2), 91-99.
- Seidel, A., Zimmels, Y. & Armon, R. (2001). Mechanism of bioleaching of coal fly ash by *Thiobacillus thiooxidans*. *Chemical Engineering Journal*, **83**(2), 123-130.
- Sekiguchi, H., Watanabe, M., Nakahara, T., Xu, B. & Uchiyama, H. (2002). Succession of Bacterial Community Structure along the Changjiang River Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Clone Library Analysis. *Applied Environmental Microbiology*, **68**(10), 5142-5150.
- Semple, K. T., Morriss, A. W. J. & Paton, G. I. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science*, **54**(4), 809-818.
- Sepic, E., Bricelj, M. & Leskovsek, H. (2003). Toxicity of fluoranthene and its biodegradation metabolites to aquatic organisms. *Chemosphere*, **52**(7), 1125-1133.
- Shaw, L. J., Morris, P. & Hooker, J. E. (2006). Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology*, **8**(11), 1867-80.
- Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S. & Myers, R. M. (1989). Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **86**(1), 232-236.
- Shen, J. & Bartha, R. (1996). Metabolic efficiency and turnover of soil microbial communities in biodegradation tests. *Applied Environmental Microbiology*, **62**(7), 2411-2415.

- Shimp, J. F., Tracy, J. C., Davis, L. C., Lee, E., Huang, W., Erickson, L. E. & Schnoor, J. L. (1993). Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **23**(1), 41 - 77.
- Shuttleworth, K. L. & Cerniglia, C. E. (1996). Bacterial degradation of low concentrations of phenanthrene and inhibition by naphthalene. *Microbial Ecology*, **31**(3), 305-317.
- Shuttleworth, K. L. & Cerniglia, C. E. (1995). Environmental aspects of PAH biodegradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **54**(1-3), 291-302.
- Siciliano, S. D., Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, G., Labelle, S., Beaumier, D., Ouellette, D., Roy, R., Whyte, L. G., Banks, M. K., Schwab, P., Lee, K. & Greer, C. W. (2001). Selection of Specific Endophytic Bacterial Genotypes by Plants in Response to Soil Contamination. *Applied Environmental Microbiology*, **67**(6), 2469-2475.
- Siegert, M., Cichocka, D., Herrmann, S., Gründger, F., Feisthauer, S., Richnow, H.-H., Springael, D. & Krüger, M. (2010). Accelerated methanogenesis from aliphatic and aromatic hydrocarbons under iron- and sulfate-reducing conditions. *FEMS Microbiology Letters*, **315**(1), 6-16.
- Simon, M. J., Osslund, T. D., Saunders, R., Ensley, B. D., Suggs, S., Harcourt, A., Wen-chen, S., Cruder, D. L., Gibson, D. T. & Zylstra, G. J. (1993). Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene*, **127**(1), 31-37.
- Sims, R. C. & Overcash, M. R. (1983). Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Residue Reviews*(68), 1-68.
- Singer, A. C., Crowley, D. E. & Thompson, I. P. (2003). Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology*, **21**(3), 123-30.
- Singer, A. C., Thompson, I. P. & Bailey, M. J. (2004). The tritrophic trinity: a source of pollutant-degrading enzymes and its implications for phytoremediation. *Current Opinion in Microbiology*, **7**(3), 239-244.
- Singh, T. & Arora, D. K. (2001). Motility and chemotactic response of *Pseudomonas fluorescens* toward chemoattractants present in the exudate of *Macrophomina phaseolina*. *Microbiological Research*, **156**(4), 343-351.
- Singh, B. K., Millard, P., Whiteley, A. S. & Murrell, J. C. (2004). Unravelling rhizosphere microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends in Microbiology*, **12**(8), 386-393.
- Sipila, T. P., Keskinen, A.-K., Akerman, M.-L., Fortelius, C., Haahtela, K. & Yrjala, K. (2008). High aromatic ring-cleavage diversity in birch rhizosphere: PAH treatment-specific changes of I.E.3 group extradiol dioxygenases and 16S rRNA bacterial communities in soil. *International Society for Microbial Ecology Journal*, **2**(9), 968-981.
- Siunova, T., Anokhina, T., Mashukova, A., Kochetkov, V. & Boronin, A. (2007). Rhizosphere strain of *Pseudomonas chlororaphis* capable of degrading naphthalene in the presence of cobalt/nickel. *Microbiology*, **76**, 182-188.
- Skjemstad, J. O. & Taylor, J. A. (1999). Does the walkley-black method determine soil charcoal? *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **30**(15), 2299 - 2310.
- Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baumgarte, S., Becker, R., Neuber, G., Kropf, S., Ulrich, A. & Tebbe, C. C. (2007). Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods*, **69**(3), 470-479.
- Smit, E., Wolters, A. & van Elsas, J. D. (1998). Self-Transmissible Mercury Resistance Plasmids with Gene-Mobilizing Capacity in Soil Bacterial Populations: Influence of Wheat Roots and Mercury Addition. *Applied Environmental Microbiology*, **64**(4), 1210-1219.
- Smolinski, Adam, Stanczyk, Krzysztof, Howaniec & Natalia. (2010). *Steam gasification of selected energy crops in a fixed bed reactor*. Elsevier, Oxford, ROYAUME-UNI.
- Smucker, A. J. M. & Erickson, A. E. (1987). Anaerobic stimulation of root exudates and disease of peas. *Plant and Soil*, **99**(2-3), 423-433.
- Soil Survey Division Staff. (1993). Soil survey manual. Soil Conservation Service. *U.S. Department of Agriculture Handbook 18*.
- Sokhn, J., De Leij, F. A. A. M., Hart, T. D. & Lynch, J. M. (2001). Effect of copper on the degradation of phenanthrene by soil micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, **33**(2), 164-168.
- Song, J., Peng, P. A. & Huang, W. (2002). Black Carbon and Kerogen in Soils and Sediments. 1. Quantification and Characterization. *Environmental Science & Technology*, **36**(18), 3960-3967.
- Sota, M., Yano, H., Ono, A., Miyazaki, R., Ishii, H., Genka, H., Top, E. M. & Tsuda, M. (2006). Genomic and Functional Analysis of the IncP-9 Naphthalene-Catabolic Plasmid NAH7 and Its Transposon Tn4655 Suggests Catabolic Gene Spread by a Tyrosine Recombinase. *Journal of Bacteriology*, **188**(11), 4057-4067.
- Sprent, J. I. (1987). The Ecology of the Nitrogen Cycle, *Cambridge Studies in Ecology*, 160p.

- Springael, D. & Top, E. M. (2004). Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends in Microbiology*, **12**(2), 53-58.
- Stach, J. E. & Burns, R. G. (2002). Enrichment versus biofilm culture: a functional and phylogenetic comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial communities. *Environmental Microbiology*, **4**(3), 169-182.
- Steinkellner, S., Lendzemo, V., Langer, I., Schweiger, P., Khaosaad, T., Toussaint, J. P. & Vierheilig, H. (2007). Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules*, **12**(7), 1290-1306.
- Stieber, M., Haeseler, F., Werner, P. & Frimmel, F. H. (1994). A rapid screening method for micro-organisms degrading polycyclic aromatic hydrocarbons in microplates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **40**(5), 753-755.
- Strom, P. F. (1999). *In Situ* Soil Remediation. *Soil Science*, **164**(12), 970.
- Stuart-Keil, K. G., Hohnstock, A. M., Drees, K. P., Herrick, J. B. & Madsen, E. L. (1998). Plasmids Responsible for Horizontal Transfer of Naphthalene Catabolism Genes between Bacteria at a Coal Tar-Contaminated Site Are Homologous to pDTG1 from *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4. *Applied Environmental Microbiology*, **64**(10), 3633-3640.
- Stülke, J. & Hillen, W. (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, **2**(2), 195-201.
- Sullivan, J. B. & Krieger, G. R. (2001). Clinical Environmental Health and Toxic Exposures. Second Edition.
- Sun, T.-R., Cang, L., Wang, Q.-Y., Zhou, D.-M., Cheng, J.-M. & Xu, H. (2010). Roles of abiotic losses, microbes, plant roots, and root exudates on phytoremediation of PAHs in a barren soil. *Journal of Hazardous Materials*, **176**(1-3), 919-925.
- Surh, Y.-J. & Miller, J. A. (1994). Roles of electrophilic sulfuric acid ester metabolites in mutagenesis and carcinogenesis by some polynuclear aromatic hydrocarbons. *Chemico-Biological Interactions*, **92**(1-3), 351-362.
- Sutherland, J. B. (1992). Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *Journal of Industrial Microbiology*, **9**(1), 53-61.
- Sverdrup, L. E., Ekelund, F., Krogh, P. H., Nielsen, T. & Johnsen, K. (2002). Soil microbial toxicity of eight polycyclic aromatic compounds: effects on nitrification, the genetic diversity of bacteria, and the total number of protozoans. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**(8), 1644-50.
- Sverdrup, L. E., Krogh, P. H., Nielsen, T., Kjaer, C. & Stenersen, J. (2003). Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), ryegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*). *Chemosphere*, **53**(8), 993-1003.
- Sverdrup, L. E., Nielsen, T. & Krogh, P. H. (2002). Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. *Environmental Science and Technology*, **36**(11), 2429-35.

## T

- Taghavi, S., Barac, T., Greenberg, B., Borremans, B., Vangronsveld, J. & van der Lelie, D. (2005). Horizontal Gene Transfer to Endogenous Endophytic Bacteria from Poplar Improves Phytoremediation of Toluene. *Applied Environmental Microbiology*, **71**(12), 8500-8505.
- Takeuchi, M., Hamana, K. & Hiraishi, A. (2001). Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**(4), 1405-1417.
- Técher, D., Martinez-Chois, C., D'Innocenzo, M., Laval-Gilly, P., Bennisroune, A., Foucaud, L. & Falla, J. (2010). Novel perspectives to purify genomic DNA from high humic acid content and contaminated soils. *Separation and Purification Technology*, **75**(1), 81-86.
- Técher, D., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennisroune, A., Formanek, P., Martinez-Chois, C., D'Innocenzo, M., Muanda, F., Dicko, A., Rejsek, K. & Falla, J. (2011). Contribution of *Miscanthus x giganteus* root exudates to the biostimulation of PAH degradation: An in vitro study. *Science of The Total Environment*, **409**, 4489-4495.
- Técher, D., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennisroune, A., Martinez-Chois, C., D'Innocenzo, M. & Falla, J. (2012a). Prospects of *Miscanthus x giganteus* for PAH phytoremediation: a microcosm study. *Industrial Crops and Products*, **36**(1), 276-281.
- Técher, D., Laval-Gilly, P., Bennisroune, A., Henry, S., Martinez-Chois, C., D'Innocenzo, M. & Falla, J. (2012b). An appraisal of *Miscanthus x giganteus* for fly ash revegetation and soil restoration. *Industrial Crops and Products*, **36**(1), 427-433.

- Teranishi, M., Toyooka, T., Ohura, T., Masuda, S. & Ibuki, Y. Benzo[a]pyrene exposed to solar-simulated light inhibits apoptosis and augments carcinogenicity. *Chemico-Biological Interactions*, **185**(1), 4-11.
- Thakuria, D., Schmidt, O., Mac Siúrtáin, M., Egan, D. & Doohan, F. M. (2008). Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**(6), 1390-1403.
- Thiele, S. & Brümmer, G. W. (2002). Bioformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil under oxygen deficient conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, **34**(5), 733-735.
- Thompson, O. A., Wolf, D. C., Mattice, J. D. & Thoma, G. J. (2008). Influence of Nitrogen Addition and Plant Root Parameters on Phytoremediation of Pyrene-contaminated Soil. *Water, air and soil pollution*, **189**(1-4), 37-47.
- Timmis, K. N., Hennessee, C. T. & Li, Q. X. (2010). Micrococcineae: *Arthrobacter* and Relatives. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer Berlin Heidelberg, 1853-1864.
- Tolle, D. A., Arthur, M. F. & Van Voris, P. (1983). Microcosm/field comparison of trace element uptake in crops grown in fly ash-amended soil. *Science of The Total Environment*, **31**(3), 243-261.
- Top, E. M. & Springael, D. (2003). The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**(3), 262-269.
- Torsvik, V., Goksoyr, J. & Daae, F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, **56**(3), 782-787.
- Tover, A., Ojangu, E.-L. & Kivisaar, M. (2001). Growth medium composition-determined regulatory mechanisms are superimposed on CatR-mediated transcription from the pheBA and catBCA promoters in *Pseudomonas putida*. *Microbiology*, **147**(8), 2149-2156.
- Tripathy, A. & Sahu, R. K. (1997). Effect of coal fly ash on growth and yield of wheat. *Journal of Environmental Biology*, **18**(2), 131-135.
- Tropel, D. & van der Meer, J. R. (2004). Bacterial Transcriptional Regulators for Degradation Pathways of Aromatic Compounds. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **68**(3), 474-500.
- Tsai, Y. L. & Olson, B. H. (1992). Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Applied Environmental Microbiology*, **58**(7), 2292-2295.
- Tsuda, M., Tan, H. M., Nishi, A. & Furukawa, K. (1999). Mobile catabolic genes in bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **87**(4), 401-410.
- Twardowska, I., Szczepanska, J. & Irena Twardowska, H. E. A. A. F. K. a. W. J. L. (2004). III.7 Coal combustion waste. *Waste Management Series*, **4**, 387-449.

## U

- Uhlířová, E. & Santrucková, H. (2003). Growth rate of bacteria is affected by soil texture and extraction procedure. *Soil Biology and Biochemistry*, **35**(2), 217-224.
- Uihlein, A., Ehrenberger, S. & Schebek, L. (2008). Utilisation options of renewable resources: a life cycle assessment of selected products. *Journal of Cleaner Production*, **16**(12), 1306-1320.
- Uselman, S. M., Qualls, R. G. & Thomas, R. B. (2000). Effects of increased atmospheric CO<sub>2</sub>, temperature, and soil N availability on root exudation of dissolved organic carbon by a N-fixing tree (*Robinia pseudoacacia* L.). *Plant and Soil*, **222**(1-2), 191-202.

## V

- Van de Wiele, T., Vanhaecke, L., Boeckaert, C., Peru, K., Headley, J., Verstraete, W. & Siciliano, S. (2004). Human Colon Microbiota Transform Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Estrogenic Metabolites. *Environmental Health Perspectives*, **113**(1).
- van der Lelie, D., Barac, T., Taghavi, S. & Vangronsveld, J. (2005). Response to Newman: New uses of endophytic bacteria to improve phytoremediation. *Trends in Biotechnology*, **23**(1), 8-9.
- van der Meer, J. R., de Vos, W. M., Harayama, S. & Zehnder, A. J. (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **56**(4), 677-694.
- van Dillewijn, P., Caballero, A., Paz, J. A., Gonzalez-Perez, M. M., Oliva, J. M. & Ramos, J. L. (2007). Bioremediation of 2,4,6-Trinitrotoluene under Field Conditions. *Environmental Science & Technology*, **41**(4), 1378-1383.
- van Elsas, J. D. & Bailey, M. J. (2002). The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiology Ecology*, **42**(2), 187-197.
- Van Elsas, J. D., Mäntynen, V. & Wolters, A. C. (1997). Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenicum* strain PCP-1 in different soils via 16S ribosomal RNA gene

- sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biology and Fertility of Soils*, **24**, 188-195.
- Van Elsas, J. D., Turner, S. & Bailey, M. J. (2003). Horizontal gene transfer in the phytosphere. *New Phytologist*, **157**(3), 525-537.
- van Herwijnen, R., Laverye, T., Poole, J., Hodson, M. E. & Hutchings, T. R. (2007). The effect of organic materials on the mobility and toxicity of metals in contaminated soils. *Applied Geochemistry*, **22**(11), 2422-2434.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van der Lelie, D. & Mench, M. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research*, **16**(7), 765-794.
- Vasseur, P. & Cossu-Leguille, C. (2003). Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International*, **28**(8), 711-717.
- Vassilev, S. V. & Vassileva, C. G. (2006). A new approach for the classification of coal fly ashes based on their origin, composition, properties, and behaviour. *Fuel*, **86**(10-11), 1490-1512.
- Velázquez, E., Rodríguez-Barrueco, C., Ramachandran, K., Srinivasan, V., Hamza, S. & Anandaraj, M. (2007). Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.) cuttings. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, **102**, 325-331.
- Venkatesan, M. I. (1988). Occurrence and possible sources of perylene in marine sediments-a review. *Marine Chemistry*, **25**(1), 1-27.
- Veranth, J. M., Fletcher, T. H., Pershing, D. W. & Sarofim, A. F. (2000). Measurement of soot and char in pulverized coal fly ash. *Fuel*, **79**(9), 1067-1075.
- Villacieros, M., Whelan, C., Mackova, M., Molgaard, J., Sanchez-Contreras, M., Lloret, J., Aguirre de Carcer, D., Oruezabal, R. I., Bolanos, L., Macek, T., Karlson, U., Dowling, D. N., Martin, M. & Rivilla, R. (2005). Polychlorinated Biphenyl Rhizoremediation by *Pseudomonas fluorescens* F113 Derivatives, Using a *Sinorhizobium meliloti* nod System To Drive bph Gene Expression. *Applied Environmental Microbiology*, **71**(5), 2687-2694.
- Vinas, M., Sabate, J., Guasp, C., Lalucat, J. & Solanas, A. M. (2005). Culture-dependent and -independent approaches establish the complexity of a PAH-degrading microbial consortium. *Canadian Journal of Microbiology*, **51**(11), 897-909.
- Vinas, M., Sabate, J., Espuny, M. J. & Solanas, A. M. (2005). Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. *Applied Environmental Microbiology*, **71**(11), 7008-7018.
- Visser, P., Pignatelli, V. & with contributions from Jørgensen, U. S. O., J.F. (2001). Utilisation of *Miscanthus*. In M.B. Jones & M. Walsh, *Miscanthus* for energy and fibre. p. 150. London: James and James.
- Visser, S. & Parkinson, D. (1992). Soil biological criteria as indicators of soil quality: Soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture*, **7**(Special Issue 1-2), 33-37.
- Vogrinic, M., Timoracka, M., Melichacova, S., Vollmannova, A. & Kreft, I. (2010). Degradation of Rutin and Polyphenols during the Preparation of Tartary Buckwheat Bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**(8), 4883-4887.

## W

- von Wandruszka, R. (1998). The Micellar Model of Humic Acid: Evidence From Pyrene Fluorescence Measurements. *Soil Science*, **163**(12), 921-930.
- Wali, M. (1999). Ecological succession and the rehabilitation of disturbed terrestrial ecosystems. *Plant and Soil*, **213**(1), 195-220.
- Walsh, M. & McCarthy, S. (1998). *Miscanthus* handbook. In *Biomass for Energy and Industry*, eds. H. Kopetz, T. Weber, W. Palz, P. Chartier & G. L. Ferrero, Centrales Agrar Rohstoff Mkt & Entwicklung Netzwerk. Rimpar, pp. 1071-1074.
- Walton Barbara, T., Guthrie Elizabeth, A. & Hoylman Anne, M. (1994). Toxicant Degradation in the Rhizosphere. *Bioremediation through Rhizosphere Technology*, **563**, 11-26.
- Wang, Y., Li, H., Zhao, W., He, X., Chen, J., Geng, X. & Xiao, M. (2010). Induction of toluene degradation and growth promotion in corn and wheat by horizontal gene transfer within endophytic bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**(7), 1051-1057.
- Warren, C. J. & Dudas, M. J. (1985). Formation of secondary minerals in artificially weathered fly ash. *Journal of environmental quality*, **14**(3), 405-410.
- Weber, D. F. & Gainey, P. L. (1962). Relative Sensitivity of Nitrifying Organisms To Hydrogen Ions in Soils and in Solutions. *Soil Science*, **94**(3), 138-145.

- Wei, S. & Pan, S. Phytoremediation for soils contaminated by phenanthrene and pyrene with multiple plant species. *Journal of Soils and Sediments*, **10**(5), 886-894.
- Weigand, H., Totsche, K. U., Huwe, B. & Kögel-Knabner, I. (2001). PAH mobility in contaminated industrial soils: a Markov chain approach to the spatial variability of soil properties and PAH levels. *Geoderma*, **102**(3-4), 371-389.
- Wenzel, W. (2009). Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant and Soil*, **321**(1), 385-408.
- Whitacre, D. M., Liu, G., Niu, Z., Niekerk, D., Xue, J. & Zheng, L. (2008). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) from Coal Combustion: Emissions, Analysis, and Toxicology. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **192**, 1-28.
- White, J. C., Kelsey, J. W., Hatzinger, P. B., Alexander & M. (1997). Factors affecting sequestration and bioavailability of phenanthrene in soils. *SETAC*, Pensacola, FL, ETATS-UNIS.
- White, P. A. (2002). The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **515**(1-2), 85-98.
- Wick, L. Y., de-Munain, A. R., Springael, D. & Harms, H. (2002). Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **58**(3), 378-385.
- Wick, L. Y., Wattiau, P. & Harms, H. (2002). Influence of the growth substrate on the mycolic acid profiles of mycobacteria. *Environmental Microbiology*, **4**(10), 612-616.
- Wilcke, W. (2007). Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. *Geoderma*, **141**(3-4), 157-166.
- Wilcke, W., Amelung, W., Martius, C., Garcia, M. V. B. & Zech, W. (2000). Biological Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Amazonian Rain Forest. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **163**(1), 27-30.
- Wilcke, W., Krauss, M. & Amelung, W. (2002). Carbon isotope signature of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): evidence for different sources in tropical and temperate environments? *Environmental Science & Technology*, **36**(16), 3530-5.
- Wilcke, W., Krauss, M., Lilienfein, J. & Amelung, W. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbon storage in a typical Cerrado of the Brazilian savanna. *Journal of Environmental Quality*, **33**(3), 946-55.
- Wilson, M. S., Herrick, J. B., Jeon, C. O., Hinman, D. E. & Madsen, E. L. (2003). Horizontal Transfer of phnAc Dioxygenase Genes within One of Two Phenotypically and Genotypically Distinctive Naphthalene-Degrading Guilds from Adjacent Soil Environments. *Applied Environmental Microbiology*, **69**(4), 2172-2181.
- Wilson, S. C. & Jones, K. C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution*, **81**(3), 229-49.
- Wintzingerode, F., Göbel, U. B. & Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, **21**(3), 213-229.
- Wolfgang, W. (2000). SYNOPSIS Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soil - a Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **163**(3), 229-248.
- Wolfgang, W., Martin, K., Gabriela, B., ccaron & íková. (2003). Persistent organic pollutant concentrations in air- and freeze-dried compared to field-fresh extracted soil samples of an eastern Slovak deposition gradient. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **166**(1), 93-101.
- Wong, J. W. C. & Su, D. C. (1997). Reutilization of coal fly-ash and sewage sludge as an artificial soil-mix: Effects of preincubation on soil physico-chemical properties. *Bioresource Technology*, **59**(2-3), 97-102.
- Wong, J. W. C. & Wongz, M. H. (1987). Co-Recycling of fly ash and poultry manure in nutrient-deficient sandy soil. *Resources and Conservation*, **13**(2-4), 291-304.
- Wrenn, B. A. & Venosa, A. D. (1996). Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*, **42**(3), 252-8.
- Wu, L., Thompson, D. K., Li, G., Hurt, R. A., Tiedje, J. M. & Zhou, J. (2001). Development and Evaluation of Functional Gene Arrays for Detection of Selected Genes in the Environment. *Applied Environmental Microbiology*, **67**(12), 5780-5790.

## X

- X31-130, N. (1999). Qualité des sols - Méthodes chimiques - Détermination de la capacité d'échange cationique (CEC) et des cations extractibles.
- Xia, J. H. & Roberts, J. K. M. (1994). Improved Cytoplasmic pH Regulation, Increased Lactate Efflux, and Reduced Cytoplasmic Lactate Levels Are Biochemical Traits Expressed in Root Tips of Whole Maize Seedlings Acclimated to a Low-Oxygen Environment. *Plant Physiology*, **105**(2), 651-657.

- Xie, F., Koziar, S. A., Lampi, M. A., Dixon, D. G., Norwood, W. P., Borgmann, U., Huang, X.-D. & Greenberg, B. M. (2006). Assessment of the toxicity of mixtures of copper, 9,10-phenanthrenequinone, and phenanthrene to *Daphnia magna*: Evidence for a reactive oxygen mechanism. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25**(2), 613-622.
- Xu, J. G. & Johnson, R. L. (1997). Nitrogen dynamics in soils with different hydrocarbon contents planted to barley and field pea. *Canadian Journal of Soil Science*, **77**(3), 453-458.
- Xu, S. Y., Chen, Y. X., Wu, W. X., Wang, K. X., Lin, Q. & Liang, X. Q. (2006). Enhanced dissipation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by combined plants cultivation. *Science of The Total Environment*, **363**(1-3), 206-215.
- Xue, W. & Warshawsky, D. (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **206**(1), 73-93.

## Y

- Yang, C.-H. & Crowley, D. E. (2000). Rhizosphere Microbial Community Structure in Relation to Root Location and Plant Iron Nutritional Status. *Applied Environmental Microbiology*, **66**(1), 345-351.
- Yang, Y., Ratté, D., Smets, B. F., Pignatello, J. J. & Grasso, D. (2001). Mobilization of soil organic matter by complexing agents and implications for polycyclic aromatic hydrocarbon desorption. *Chemosphere*, **43**(8), 1013-1021.
- Ye, B., Saito, A. & Minamisawa, K. (2005). Effect of Inoculation with Anaerobic Nitrogen-Fixing Consortium on Salt Tolerance of *Miscanthus sinensis*. *Soil Science & Plant Nutrition*, **51**(2), 243-249.
- Yen, K.-M., Serdar, C. M. & Gunsalus, I. C. (1988). Genetics of Naphthalene Catabolism in Pseudomonads. *Critical Reviews in Microbiology*, **15**(3), 247-268.
- Yeom, I. T., Ghosh, M. M., Cox, C. D. & Ahn, K. H. (1996). Dissolution of polycyclic aromatic hydrocarbons from weathered contaminated soil. *Water Science and Technology*, **34**(7-8), 335-342.
- Yeom, S. & Yoo, Y. (1997). Overcoming the inhibition effects of metal ions in the degradation of benzene and toluene by *Alcaligenes xylosoxidans*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, **14**(3), 204-208.
- Yi, H. & Crowley, D. E. (2007). Biostimulation of PAH Degradation with Plants Containing High Concentrations of Linoleic Acid. *Environmental Science & Technology*, **41**(12), 4382-4388.
- Yoshitomi, K. J. & Shann, J. R. (2001). Corn (*Zea mays* L.) root exudates and their impact on 14C-pyrene mineralization. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**(12-13), 1769-1776.
- Young, C. C., Burghoff, R. L., Keim, L. G., Minak-Bernero, V., Lute, J. R. & Hinton, S. M. (1993). Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. *Applied Environmental Microbiology*, **59**(6), 1972-4.
- Yu, H. (2002). Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and phototoxicity. *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, **20**(2), 149 - 183.
- Yunusa, I. A. M., Eamus, D., DeSilva, D. L., Murray, B. R., Burchett, M. D., Skilbeck, G. C. & Heidrich, C. (2006). Fly-ash: An exploitable resource for management of Australian agricultural soils. *Fuel*, **85**(16), 2337-2344.

## Z

- Zaporozhenko, E. V., Slobodova, N. V., Bulygina, E. S., Kravchenko, I. K. & Kuznetsov, B. B. (2006). Method for rapid DNA extraction from bacterial communities of different soils. *Mikrobiologiya*, **75**(1), 127-34.
- Zeinali, M., Vossoughi, M. & Ardestani, S. K. (2007). Characterization of a moderate thermophilic *Nocardia* species able to grow on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Letters in applied microbiology*, **45**(6), 622-628.
- Zevenbergen, C., Bradley, J. P., Van Reeuwijk, L. P., Shyam, A. K., Hjelmar, O. & Comans N. R. J. (1999). Clay formation and metal fixation during weathering of coal fly ash. *Environmental science & technology*, **33**(19), 3405-3409.
- Zhang, Z., Rengel, Z. & Meney, K. (2010). Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) differentially influence growth of various emergent wetland species. *Journal of Hazardous Materials*, **182**(1-3), 689-695.
- Zhong, Y., Luan, T., Wang, X., Lan, C. & Tam, N. (2007). Influence of growth medium on cometabolic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. strain PheB4. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **75**(1), 175-186.
- Zhong, Y., Zou, S., Lin, L., Luan, T., Qiu, R. & Tam, N. F. Y. (2010). Effects of pyrene and fluoranthene on the degradation characteristics of phenanthrene in the cometabolism process by *Sphingomonas* sp. strain PheB4 isolated from mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, In Press, Corrected Proof.

- Zhou, J., Bruns, M. A. & Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied Environmental Microbiology*, **62**(2), 316-22.
- Zhou, J. & Thompson, D. K. (2002). Challenges in applying microarrays to environmental studies. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**(3), 204-207.
- Zhuang, X., Chen, J., Shim, H. & Bai, Z. (2007). New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International*, **33**(3), 406-413.
- Zikeli, S., Jahn, R. & Kastler, M. (2002). Initial soil development in lignite ash landfills and settling ponds in Saxony-Anhalt, Germany. *Journal of plant nutrition and soil science*, **165**(4), 530-536.
- Zikeli, S., Kastler, M. & Jahn, R. (2004). Cation exchange properties of soils derived from lignite ashes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **167**(4), 439-448.
- Zikeli, S., Kastler, M. & Jahn, R. (2005). Classification of anthrosols with vitric/andic properties derived from lignite ash. *Geoderma*, **124**(3-4), 253-265.
- Zub, H. W. & Brancourt-Hulmel, M. (2010). Agronomic and physiological performances of different species of *Miscanthus*, a major energy crop. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **30**(2), 201-214.

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des 16 HAP établis comme polluants prioritaires par l'USEPA .....	17
Tableau 2 : Estimations des concentrations en fluorème, phénanthène, fluoranthène et pyrène induisant une inhibition de 50% de la germination chez la moutarde, le trèfle rouge et l'ivraie .....	26
Tableau 3 : Production et stock des cendres volantes en France.....	28
Tableau 4 : Composition chimique relative des cendres volantes silico-alumineuses.....	33
Tableau 5 : Principaux genres bactériens dégradants isolés à partir des sols.....	40
Tableau 6 : Mécanismes de phytoremédiation potentiels en fonction de la nature des contaminants .....	57
Tableau 7 : Effets des différentes classes de composés organiques des sécrétions racinaires sur l'expression génique et la biodégradation des HAP. ....	75
Tableau 8 : Récapitulatif des cultures réalisées en microcosmes et des paramètres mesurés. ....	111
Tableau 9 : Caractéristiques physico-chimiques du sol standard A3 .....	114
Tableau 10 : Paramètres physico-chimiques et biologiques mesurés pour la caractérisation initiale des sols. ....	116
Tableau 11 : Concentrations en produits rhizosphériques testées .....	126
Tableau 12 : Modalités testées en plan factoriel complet. ....	127
Tableau 13 : Concentrations en métabolites secondaires testées pour les plans de type « Uniform Design » .....	129
Tableau 14 : Plan des essais en microcosmes sur sol standard A3 (PE1).....	130
Tableau 15 : Conditions expérimentales testées durant la première série d'optimisation de l'étape d'extraction-purification d'ADN de sol.....	136
Tableau 16 : Comparaison de la teneur en acides aminés des produits rhizosphériques de MxG à celle des exsudats racinaires .....	143
Tableau 17 : Identification des sucres majoritaires présents dans les exsudats racinaires.....	144
Tableau 18 : Composition en acides phénoliques des produits rhizosphériques de MxG .....	145
Tableau 19 : Concentration relative en polyphénols extractibles au méthanol dans les exsudats racinaires de MxG	146
Tableau 20 : Identification des souches bactériennes pré-sélectionnées et isolées selon les 4 modalités d'enrichissement.....	149
Tableau 21 : Identification des souches bactériennes isolées à partir du sol de friche contaminé selon les 4 modalités d'enrichissement .....	153
Tableau 22 : Affiliation phylogénétique des bactéries indiquées à la figure 34 basée sur l'analyse des séquences géniques d'ADNr 16S.....	173
Tableau 23 : Récapitulatif des combinaisons C0 à C11 de quercétine, d'apigénine, de catéchine et d'acide gallique testés en mélange à 11 niveaux (ou doses) différents .....	189
Tableau 24 : Caractéristiques physico-chimiques des différents sols étudiés.....	194
Tableau 25 : Teneurs en cations extractibles et en éléments traces métalliques des cendres et du sol A3 « référence ».....	196
Tableau 26 : Teneurs en métaux dans les sols de « référence » et cendres.....	197
Tableau 27 : Teneurs en métaux dans les sols de friche H1, H2 et M2.....	198
Tableau 28 : Pourcentages d'individus « sensibles » et moribonds selon les types de sols .....	200
Tableau 29 : Evaluation de la pureté des ADN extraits par amplification directe en PCR des ADNr 16S.....	203

Tableau 30 : Affiliation phylogénétique des bactéries du sol H1 basée sur l'analyse des séquences géniques d'ADNr 16S. ....	215
Tableau 31 : Affiliation phylogénétique des bactéries des sols H2 et M2 basée sur l'analyse des séquences géniques d'ADNr 16S. ....	221
Tableau 32 : pH et conductivité électrique mesurés dans la fraction hydrosoluble des sols après essais en microcosmes.....	229
Tableau 33 : Carbone organique dissout (C.O.D) mesuré dans la fraction hydrosoluble des sols après les essais en microcosmes .....	230
Tableau 34 : Dénombrement des bactéries totales cultivables, nitrifiantes, azotofixatrices libres et nitrifiantes .....	231
Tableau 35 : Affiliation phylogénétique des bactéries des cendres basée sur l'analyse des séquences géniques d'ADNr 16S. ....	232
Tableau 36 : Nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) mesurés dans la fraction hydrosoluble des sols après les essais en microcosmes.....	233
Tableau 37 : Teneurs en phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) mesurées dans la fraction hydrosoluble des sols après les essais en microcosmes.....	235
Tableau 38 : Teneurs en oxydes de potassium ( $\text{K}_2\text{O}$ ) mesurés dans la fraction hydrosoluble des sols après les essais en microcosmes .....	236
Tableau 39 : Récapitulatif des tests de croissance algale : équations de régression linéaire.....	237

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Bioactivation séquentielle du benzo(a)pyrène .....	21
Figure 2 : Régions moléculaires impliquées dans la formation de diol-époxydes .....	21
Figure 3 : Principe de fonctionnement d'une centrale thermique à charbon.....	29
Figure 4 : Nomenclature des positions du benzène substitué.....	43
Figure 5 : Exemple de réaction stéréosélective à partir d'un cycle benzénique substitué.....	44
Figure 6 : Voies de biodégradation identifiées pour le naphthalène .....	45
Figure 7 : Voies de biodégradations identifiées pour le pyrène.....	47
Figure 8 : Mécanismes de transferts horizontaux de gènes chez les bactéries.....	51
Figure 9 : Schéma constitutif d'un îlot génomique.....	52
Figure 10 : Mécanismes majeurs de biodégradation des HAP.....	54
Figure 11 : Interactions moléculaires entre plantes et organismes dans la rhizosphère.....	60
Figure 12 : Xénobiotiques structurellement analogues aux métabolites secondaires des plantes .....	74
Figure 13 : Taxonomie de <i>Miscanthus x giganteus</i> .....	89
Figure 14 : Cycle de développement de <i>Miscanthus x giganteus</i> .....	90
Figure 15 : Plantation de <i>Miscanthus x giganteus</i> .....	91
Figure 16 : Organigramme du plan de thèse.....	101
Figure 17 : Désherbage manuel et délimitation des micro-parcelle.....	108
Figure 18 : Agencement des parcelles sur site contaminé.....	108
Figure 19 : Agencement des parcelles dans le parc à cendres.....	109

Figure 20 : Schéma général du protocole d'extraction-purification d'ADN de sols. ....	137
Figure 21 : Profil des teneurs moyennes en HAP dans les trois sols de friche contaminés H1, H2 et M2. ....	141
Figure 22 : Effets comparatifs de l'ajout de produits rhizosphériques de MxG, d'extraits de levure (YEPG) et de glucose sur la croissance de la culture bactérienne mixte LP .....	156
Figure 23 : Effets comparatifs de l'ajout de produits rhizosphériques de MxG, d'extraits de levure (YEPG) ou de glucose sur l'activité de dégradation globale de la culture bactérienne mixte LP en milieu minimum .....	157
Figure 24 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur la croissance des cultures mixtes des souches pré-sélectionnées; milieu riche .....	159
Figure 25 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur l'activité de dégradation globale par les cultures mixtes des souches pré-sélectionnées; milieu riche..	160
Figure 26 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur la croissance bactérienne des cultures mixtes du sol de friche; milieu riche .....	162
Figure 27 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur la dégradation par les cultures mixtes des souches du sol de friche; milieu riche.....	163
Figure 28 : Effets comparatifs à moyen terme (45 jours) de la présence de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur la croissance bactérienne des cultures mixtes des souches pré-sélectionnées; milieu minimum .....	165
Figure 29 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur l'activité de dégradation globale en milieu minimum par les cultures mixtes des souches pré-sélectionnées; milieu minimum (45 jours) .....	166
Figure 30 : Effets comparatifs à long terme (80 jours) de la présence de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur la croissance (A) et l'activité de biodégradation (B) des cultures mixtes des souches du laboratoire.....	167
Figure 31 : Effets comparatifs à moyen terme (45 jours) de l'ajout de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur la croissance bactérienne des cultures mixtes du sol de friche en milieu minimum.....	169
Figure 32 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux sur la dégradation par les cultures mixtes du sol de friche en milieu minimum (45 jours) .....	170
Figure 33 : Effets comparatifs à moyen terme (45 jours) de la présence de HAP, des exsudats racinaires totaux de MxG, ou de la combinaison des deux : A) sur la croissance bactérienne, B) sur l'activité globale de dégradation, mesurées à partir de suspensions bactériennes issues des sols de friche H2 et M2.....	171
Figure 34 : Profils de diversité des souches majoritaires des suspensions-dilutions de sols H2 et M2 après culture en présence de HAP, des exsudats totaux de MxG ou de la combinaison des deux.....	172
Figure 35 : Effets comparatifs à moyen terme de l'ajout de quercétine ou de rutine : A) sur la croissance bactérienne, B) sur l'activité globale de dégradation, en présence ou non de HAP, évalués après incubation de la culture mixte LP .....	175
Figure 36 : Effets comparatifs à moyen terme de l'ajout de rutine : A) sur la croissance bactérienne, B) sur l'activité globale de dégradation, en présence ou non de fluorène, de phénanthrène, de fluoranthène ou de pyrène, évalués après incubation de la culture mixte LP.....	176

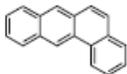
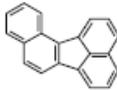
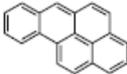
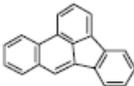
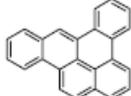
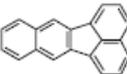
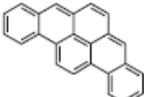
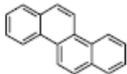
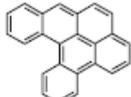
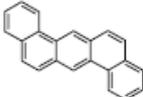
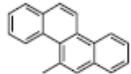
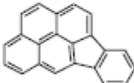
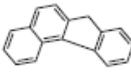
Figure 37 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique, de catéchine, d'apigénine et de quercétine, seuls ou en combinaison, sur la croissance de la culture mixte LP en milieu riche .....	178
Figure 38 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique, de catéchine, d'apigénine et de quercétine, seuls ou en combinaison, sur la dégradation par la culture mixte LP en milieu riche .....	179
Figure 39 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique, de catéchine, d'apigénine et de quercétine, seuls ou en combinaison, sur la croissance de la culture mixte SPP en milieu riche.....	181
Figure 40 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique, de catéchine, d'apigénine et de quercétine, seuls ou en combinaison, sur la dégradation par la culture mixte SPP en milieu riche .....	182
Figure 41 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique, de catéchine, d'apigénine et de quercétine, seuls ou en combinaison, sur la croissance la culture mixte LP en milieu minimum.....	183
Figure 42 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique, de catéchine, d'apigénine et de quercétine, seuls ou en combinaison, sur la dégradation par la culture mixte LP en milieu minimum.....	185
Figure 43 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique, de catéchine, d'apigénine et de quercétine, seuls ou en combinaison, sur la croissance de la culture mixte SPP en milieu minimum .....	186
Figure 44 : Effets comparatifs de l'ajout de HAP, d'acide gallique, de catéchine, d'apigénine et de quercétine, seuls ou en combinaison, sur la dégradation par la culture mixte SPP en milieu minimum.....	187
Figure 45 : Effets comparatifs de la combinaison à différentes doses de quercétine, d'apigénine, de catéchine et d'acide gallique sur la croissance de la culture mixte SPP en présence de HAP en milieu minimum .....	190
Figure 46 : Effets comparatifs de la combinaison à différentes doses de quercétine, d'apigénine, de catéchine et d'acide gallique sur la dégradation par la culture mixte SPP en présence de HAP en milieu minimum .....	191
Figure 47 : Effets comparatifs de la combinaison à différentes doses de quercétine, d'apigénine, de catéchine et d'acide gallique sur la croissance de la culture mixte LP en présence de HAP en milieu minimum .....	192
Figure 48 : Effets comparatifs de la combinaison à différentes doses de quercétine, d'apigénine, de catéchine et d'acide gallique sur la dégradation par la culture mixte LP en présence de HAP en milieu minimum.....	193
Figure 49 : Caractérisation de l'écotoxicité des sols (sol de référence, H2 et M2) avant culture : évolution de la biomasse globale des vers de terre.....	199
Figure 50 : ADN totaux extrait des sols "H2", "M2", "E" et "S" en fonction de l'ajout de KCl/CTAB/AH.....	202
Figure 51 : ADN totaux extrait des sols "M2" et "S" en fonction du pH et du volume de CTAB.....	205
Figure 52 : Analyse par méthode UPGMA des profils TTGE obtenus après migration des fragments d'ADNr 16S (méthode CTAB-vitamines, tampon de lyse à pH 7,5). .....	206
Figure 53 : Dénombrement de la microflore totale en sol A3.....	208
Figure 54 : Dénombrement de la microflore dégradante en sol A3 .....	209
Figure 55 : Détermination de la fraction de HAP extractible à l'hexane après culture (sol A3).....	211
Figure 56 : Profil de diversité bactérienne (ADNr 16S) des différentes modalités en microcosmes (sol A3) .....	212
Figure 57 : Dénombrement des bactéries cultivables totales et dégradantes en sol de friche H1 après culture. ....	214
Figure 58 : Comparaison des profils de diversité bactérienne du sol H1 (t <sub>0</sub> , pots non plantés et plantés).....	215
Figure 59 : Concentrations totales en différentes classes de HAP extractibles à l'hexane dans le sol de friche H1 ..	216
Figure 60 : Concentrations individuelles en HAP extractibles à l'hexane dans le sol H1 .....	217
Figure 61 : Dénombrement des bactéries cultivables totales et dégradantes dans les sols H2 et M2 après culture....	218
Figure 62 : Comparaison des profils de diversité bactérienne des sols H2 et M2 (t <sub>0</sub> , pots non plantés et plantés) ....	220

Figure 63 : Concentrations totales en différentes classes de HAP extractibles à l'hexane dans les sols H2 et M2...	222
Figure 64 : Concentrations individuelles en HAP extractibles à l'hexane dans les sols de friche H2 et M2 .....	223
Figure 65 : Croissance de <i>Miscanthus x giganteus</i> en sol de « référence », sols de friche H2, M2 et cendres .....	225
Figure 66 : Poids sec et teneur en eau des différentes parties végétales après croissance en sol de référence, sols de friche H2, M2 et cendres .....	227
Figure 67 : Teneurs en chlorophylle a et b des feuilles en fonction du substrat de culture : sol de « référence », sols de friche H2, M2 et cendres.....	228
Figure 68 : Comparaison des profils de diversité bactérienne des cendres (t <sub>0</sub> , pots non plantés et plantés) .....	232
Figure 69 : Croissance de MxG en micro-parcelles sur sols de friche contaminés .....	239
Figure 70 : Aspect des plants de MxG au niveau des sols de friche.....	239
Figure 71 à 77 : Suivi de la culture de MxG dans le parc à cendres.....	241-243
Figure 78 : Croissance de MxG au niveau du parc a cendres après la pose de grillages fins.....	244
Figure 79 : Interactions entre <i>Miscanthus x giganteus</i> , bactéries rhizosphériques, HAP et sols.....	249

# VI. ANNEXES

## ANNEXE 1

**Liste des 15 + 1 HAP prioritaires de l'Union Européenne** (en distinction des « 16 HAP » de l'USEPA), avec leur poids moléculaire (g/mol) entre parenthèses, classés comme potentiellement génotoxiques et cancérigènes par le Comité Scientifique sur l'Alimentation (2002) et le Comité d'Experts sur les Additifs Alimentaires de l'Organisation Mondiale de la Santé (JECFA, 2005), à droite ceux ne figurant pas dans la liste des 16 HAP prioritaires de l'USEPA, d'après Danyi et al., 2009.

1	<b>Benzo[a]anthracène</b> (228)		9	<b>Benzo[j]fluoranthène</b> (252)	
2	<b>Benzo[a]pyrène</b> (252)		10	<b>Cyclopental[cd]pyrène</b> (226)	
3	<b>Benzo[b]fluoranthène</b> (252)		11	<b>Dibenzo[a,e]pyrène</b> (302)	
4	<b>Benzo[g,h,i]pérylène</b> (276)		12	<b>Dibenzo[a,h]pyrène</b> (302)	
5	<b>Benzo[k]fluoranthène</b> (252)		13	<b>Dibenzo[a,i]pyrène</b> (302)	
6	<b>Chrysène</b> (228)		14	<b>Dibenzo[a,l]pyrène</b> (302)	
7	<b>Dibenzo[a,h]anthracène</b> (278)		15	<b>5-Méthylchrysène</b> (242)	
8	<b>Indeno[1,2,3-cd]pyrène</b> (276)		+ 1	<b>Benzo[c]fluorène</b> (216)	

## ANNEXE 2 : Méthodes physico-chimiques et biologiques de réhabilitation des sols pollués

L'ensemble de ces méthodes sont résumées dans les tableaux ci-après (Bamforth & Singleton, 2005; Bennett, 1995; Chaudhry et al., 2005; Dadkhah & Akgerman, 2002; Gan et al., 2009; Goi et al., 2006; Kanaly & Harayama, 2000; Khan et al., 2004; Khodadoust et al., 2000; Ma et al., 2010a; Naidu, 2003; Rehmann et al., 2008; Rivas et al., 2009; Romantschuk et al., 2000; Saison et al., 2004).

<b>Physiques</b>	<b>Piégeage</b>	<b>Confinement</b> <i>surveillance du site (piézomètres)</i>	Isolement du sol avec des matériaux argileux et/ou synthétiques utilisés en couverture, en injection dans la matrice ou en enrobage (encapsulation)
		<b>Solidification</b> <i>application à des sols excavés</i>	Piégeage des polluants dans une matrice constituée d'un mélange de sol et de réactifs pouzzolaniques, cimentants ou polymérisants : obtention d'un matériau composite solide, peu perméable et non réactif
		<b>Stabilisation</b> <i>technique délaissée</i>	A la chaux ou par des argiles : pollutions liées à la créosote ou à des déversements de pétrole
	<b>Evacuation</b>	<b>Excavation</b>  <i>suppression rapide de la source de pollution locale méthode la plus simple mais coûteuse si pollution étendue et action sur la cohésion du sol (rebouchées avec le sol traité ou du matériel propre)</i>	Centre d'enfouissement : acheminement des terres vers un centre d'enfouissement technique ou un centre de traitement spécialisé
			« Soil flushing » : homogénéisation d'un mélange sol-eau puis tamisé en plusieurs fractions : séparation des sables, des limons et des argiles (par hydrocyclonage); floculation, épaissement et filtration des fractions les plus fines concentrées en polluants et traitement. Le système fonctionne en circuit fermé; ajouts possibles de tensioactifs au fluide de lessivage pour améliorer la récupération des HAP.
		<b>Pompage et Traitement</b>  <i>mise en oeuvre et durée de traitement assez rapide, de 3 à 18 mois</i>	- Technique la plus classique, parfaitement maîtrisée : permet de confiner hydrauliquement la pollution et de procéder à une décontamination en surface de l'eau pompée pour la réinjecter (avec ajouts de tensioactifs) - Possibilité d'améliorer significativement la technique en utilisant une extraction par injection de vapeur (230 à 270 °C) combinée à une oxydation chimique (O <sub>2</sub> ou H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
	<b>Pompage-écrémage</b>  <i>Coût relativement élevé : 23 000 à 76000 € hors pompage de rabattement pour une opération moyenne de type station service</i>		Elimination rapide d'une grande quantité de polluant par pompage sélectif des produits flottants au toit de la nappe (méthode couplée à un rabattement de nappe <i>via</i> une tranchée ou un fossé, ou à l'aide de pompes); couplée à des méthodes permettant de traiter le polluant restant (~ 50 % de la quantité initiale contenue dans le sol)

<b>Thermiques</b>	<p><b>Désorption thermique</b> <i>procédé est bien adapté aux sols contaminés par des hydrocarbures</i></p>	Introduction du sol débarrassé des fractions grossières dans un désorbeur ou four rotatif; le sol est constamment agité pendant l'opération. Le transfert physique des polluants de la phase solide vers la phase gazeuse ou désorption-volatilisation est assuré par chauffage de 250 à 600 °C. Les gaz émis sont traités en sortie.
	<p><b>Incinération</b> <i>très coûteuse (380 €/t) et dégagement de fumées toxiques nécessitant traitements et surcoûts</i></p>	Seule technique détruisant réellement les polluants, par élévation de température du sol introduit dans un four à plus de 1000°C
	<p><b>Vitrification</b> <i>traitement rapide : 3 à 5 tonnes par heure, taux de lessivage très bas mais profondeur et surface à traiter limitée, consommation énergétique élevée durant l'opération (et coûteuse) : 750 kWh.t; empêche la réapparition d'un tapis végétal</i></p>	Méthode thermique <i>in situ</i> se rapprochant de la stabilisation : transformation du sol en un matériau fondu inerte, <i>i.e.</i> verre silicaté, par élévation de température à 2000°C

<b>Chimiques</b>	<p><b>Mobilisation-extraction</b> <i>facilité de mise en place, rendement intéressant mais risque de migration non contrôlée de la pollution si traitement in situ et toxicité potentielle des eaux de lessivage (choix du tensioactif)</i></p>	Aspersion du sol par une solution chimiquement réactive, contenant un tensioactif, puis drainage, pompage purification de la solution récupérée et réinjection en cycles continus (éventuellement sur de très longues périodes)
	<p><b>Réactions chimiques (in situ)</b> <i>élimination potentiellement importante des HAP mais action non spécifique, altération de la matière organique du sol, coût supplémentaire</i></p>	<p><b>Ozone (O<sub>3</sub>)</b></p> <p>95 % d'élimination du phénanthrène pour une durée d'ozonation de 2,3 heures et un flux d'ozone de 250 mg/h dans du sable; 91 % pour le pyrène en 4 heures de traitement et un flux d'ozone de 600 mg/h; 50 % pour l'anthracène</p>
	<p><b>Eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b></p> <p>Permet de traiter les zones saturées, action pouvant être catalysée par l'action des rayons UV ou du fer ferreux (Réactif de Fenton) ou améliorée par ajout d'huile végétale afin de désorber les HAP lourds (benzo[a]pyrène, dibenzo[a,h]anthracène)</p>	

**Biologiques**

<p><b>Atténuation naturelle</b> <i>(technique la moins coûteuse, mais extension potentielle de la pollution)</i></p>	<p>Aucune intervention d'origine anthropique, dissipation des HAP par des processus de biodégradation naturelle sans « adjuvant »</p>
<p><b>Biodégradation <i>in situ</i> (biostimulation)</b> <i>coût élevé, caractère corrosif et pouvoir désinfectant de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à fortes doses</i></p>	<p>Pompage et injection d'oxygène sous forme gazeuse (O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>) ou liquide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et injection de nutriments favorisant l'activité microbienne; possibilité d'amélioration de la biodégradation par ajouts de tensioactifs</p>
<p><b>Traitement en bioréacteur ou « bioslurry »</b>  <i>facilité à contrôler et à maintenir les conditions optimales de réaction; durées de traitement courtes (6 à 9 mois); structure du sol peu altérée et réutilisation envisageable en reconstruction paysagère; coûts élevés mais moins chers que l'incinération (85 à 230 €/t); efficacité moindre pour les HAP lourds et toxicité potentielle des intermédiaires de dégradation</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Excavation du sol, broyage, tamisage, homogénéisation et mélange à de l'eau, 30 % en poids/volume, puis introduction par pompage dans le réacteur (en continu ou en discontinu)</li> <li>- Généralement transfert en chaîne de la boue d'un réacteur à un autre et ajouts réguliers de nutriments pour assurer des rapports optimums de carbone, azote et phosphore aux microorganismes</li> <li>- Bioaugmentation possible (ajouts de microorganismes)</li> <li>- Technique efficace pour des teneurs en HAP de 2,5 à 250 g/kg de sol; taux d'élimination de 98-99 % des HAP à 3 cycles, 85-95 % pour ceux à 4 cycles et 55-85 % pour ceux à plus de 4 cycles</li> </ul>
<p><b>Bioterte et « landfarming » (réacteur à l'air libre)</b> <i>coûts de l'ordre de 45 à 80 €/t, durée de traitement de 12 à 24 mois pour un taux moyen d'élimination des HAP de 80 % en fonction des types de molécules</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Excavation, étalement et retournements du sol sur des surfaces imperméables, à hauteurs variables de quelques dizaines de centimètres,</li> <li>- ajouts potentiels de compost / nutriments pour faciliter la biodégradation par les microorganismes; bioaugmentation possible</li> </ul>
<p><b>Biopile</b>  <i>après 9 mois de traitement, 80 % de dégradation des HAP observable</i></p>	<p>Même principe que les biotertes mais appliqué à des sols contenant des polluants volatils en quantités non négligeables : réacteurs où les flux de gaz et de liquide sont parfaitement contrôlés avec systèmes d'aspersion et de drainage, système de ventilation/extraction des gaz émis, couverture étanche (géomembrane)</p>
<p style="text-align: center;"><b>Phytoremédiation</b></p> <p>Technique de bioremédiation incluant la <b>biodégradation</b> des polluants organiques <i>via</i> la stimulation des communautés microbiennes dégradantes au niveau racinaire <i>dissipation des HAP dont ceux de cinq à six cycles, méthode la moins coûteuse (environ 8 à 40€/ tonne de sol traitée, énergie solaire) et non invasive, mais lente (plusieurs années)</i></p>	

### ANNEXE 3 : Composition des milieux de culture

#### Milieu minimum « Basalt Salt Mineral Yeast extracts » (BSMY)

La composition du milieu minimum BSMY (utilisé durant les enrichissements des différents *cultures mixtes* bactériens en présence de pyrène, pyrène + phénanthrène, pyrène + salicylate, pyrène + gazoil) est la suivante, par litre d'eau distillée qsp (Juhasz et al., 1997) :

- 0,4 g  $K_2HPO_4$
  - 0,4 g  $KH_2PO_4$
  - 0,4 g  $(NH_4)_2SO_4$
- } BSM
- 0,3 g NaCl
  - 50 mg d'extraits de levure Y
  - 5 mL d'une solution d'éléments traces (Bogardt & Hemmingsen, 1992)
  - 5 mL d'une solution de vitamines (Bogardt & Hemmingsen, 1992)
  - 5 mL d'une solution de magnésium/calcium à 0,4 g  $MgSO_4$  et 0,4 g  $CaCl_2$  par litre

d'eau distillée qsp.

Les solutions d'éléments traces, de vitamines et de [magnésium + calcium] sont stérilisées par filtration (0,22  $\mu m$ , Millipore) et ajoutées au milieu après autoclavage. La solution d'éléments traces contient (par litre d'eau distillée) : 200 mg  $FeSO_4$ , 10 mg  $ZnSO_4$ , 3 mg  $MnCl_2$ , 20 mg  $CoCl_2$ , 1 mg  $CuCl_2$ , 2 mg  $NiCl_2$ , 500 mg  $Na_2MoO_4$  et 30 mg  $H_3BO_3$  (Bogardt & Hemmingsen, 1992). La solution de vitamines contient (pour 100 mL d'eau distillée qsp) : 2 mg biotine, 2 mg acide folique, 5 mg thiamine HCl, 5 mg D-calcium pantothenate, 5 mg vitamine B12, 5 mg riboflavine, 20 mg niacine, 3 mg pyridoxal HCl et 2 mg acide para-amino-benzoïque (Bogardt & Hemmingsen, 1992). Lorsque le milieu BSMY est utilisé en gélose, il est solidifié par ajout de 1,5% d'agar et 100  $\mu L$  de la solution de vitamines est introduite au moment de couler les géloses.

#### Préparation des erlens de culture contenant les HAP (pyrène et phénanthrène) :

Des solutions mères à 2% (P/V) de pyrène et de phénanthrène sont préparées en solubilisant 160 mg de chaque HAP dans 8mL de diméthylformamide (N,N-DMF). Ces solutions sont stérilisées par filtration à 0,22  $\mu m$  et conservée dans des flacons ambrés à 4°C. 750 $\mu L$  sont ajoutés par erlen de culture (pour un volume final de 75mL de milieu correspondant à une concentration de 200 mg de HAP/L). Le N,N-DMF est laissé à évaporer sous hotte à flux laminaire durant 2h avant ajout du milieu BSMY et des suspensions bactériennes.

**Composition du milieu minimum de Bushnell-Hass, utilisé durant les cultures en microplaques :**

Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> )	0,2 g/L
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> )	0,02 g/L
Phosphate de mono-potassium K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g/L
Nitrate de potassium	1,0 g/L
Chlorure ferrique	0,05 g/L
Chlorure de sodium (NaCl)	0,85 % (p/v)
Eau distillée	qsp 1 L

**Composition du milieu riche YEPG, utilisé durant les cultures en microplaques :**

Extrait de levure	5 g/L
Peptone de caséine	10 g/L
D (+) – glucose	10 g/L
Eau distillée	qsp 1 L

Ce milieu est dilué au 1/10 avec de l'eau distillée si nécessaire.

#### ANNEXE 4 : Définition du « Uniform Design »

Le « Uniform Design » (UD) est un plan d'expérience factoriel fractionné proposé pour la première fois par les professeurs Fang Kai-Tai et Wang Yuan en 1980 (Fang et al., 2000). Il a été utilisé avec succès et reconnu comme un plan d'expérience robuste dans divers domaines relatifs à l'ingénierie chimique, pharmaceutique, l'ingénierie de la qualité, des systèmes, de la surveillance, de l'informatique et des sciences naturelles (Guoqing et al., 2006). Un plan d'expérience de type UD permet une représentation uniforme des essais expérimentaux dans l'espace. En d'autres termes, le UD permet la réalisation d'essais représentatifs dans le domaine expérimental étudié, avec robustesse, *i.e.* sans présomption forte au niveau du modèle à choisir, et permet d'établir le nombre de niveaux le plus grand possible pour chaque facteur parmi tous les plans d'expérience (Fang et al., 2000). Le UD a deux caractéristiques : un niveau donné d'un facteur n'apparaît qu'une seule fois dans les expériences et le nombre d'essais expérimentaux égale le nombre de niveaux des facteurs. De cette manière, la durée et la « lourdeur » expérimentale peuvent être considérablement réduites tout en améliorant l'efficacité des expériences (Fang et al., 2000). Les tables de UD peuvent s'écrire de la manière suivante :  $U_n(q_s)$  où U indique qu'il s'agit d'un plan factoriel de type « Uniform Design », n le nombre d'essais expérimentaux (nombre de combinaisons réalisées), q le nombre de niveaux, et s le nombre de facteurs. Dans la table ci-dessous, à chaque colonne correspond un facteur, et chaque ligne correspond à un essai expérimental parmi le nombre total ayant été choisi pour être réalisé. Pour des expériences à 4 facteurs et 10 niveaux par exemple, la table de combinaisons correspondant à une répartition uniforme des essais de type UD est :

Table de UD  $U_{10}(10^4)$  pour 4 facteurs et 10 niveaux :

Essais	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Facteur 4
1	1	4	3	5
2	5	6	7	1
3	8	2	2	2
4	4	7	1	9
5	6	3	10	6
6	7	10	4	7
7	10	8	5	4
8	9	5	8	10
9	2	9	9	3
10	3	1	6	8

Le UD a plus de niveaux que de facteurs, permettant d'établir des équations de régression de plus grande précision en nécessitant très peu d'essais expérimentaux contrairement à la méthode conventionnelle des moindres carrés (Fang et al., 2000; Guoqing et al., 2006).

## ANNEXE 5 : Protocoles de préparation et d'analyses de sols

### A) Echantillonnage, collecte et préparation des sols

La préparation de des échantillons globaux de sols a été réalisée selon la norme NF ISO 11464 (AFNOR 1994). Les différentes étapes qui ont été suivies sont résumées (figure 13) :

Étalement en effritant grossièrement à la main les fractions les plus compactes



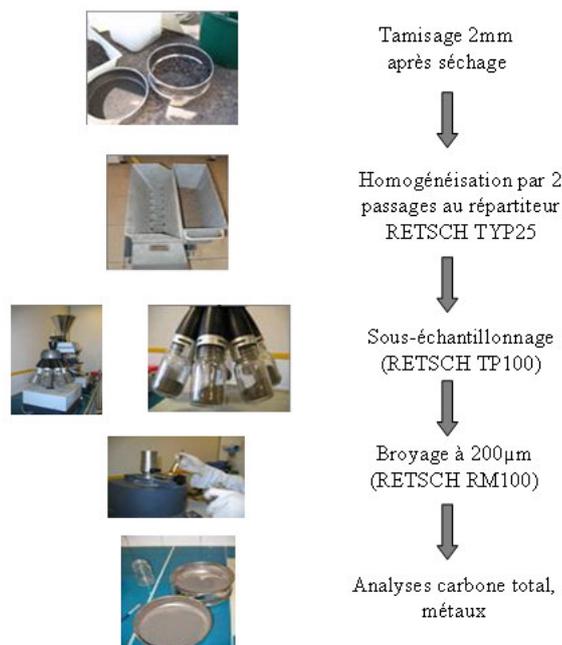
Séchage de 3 jours à température ambiante, broyage au mortier des fractions résiduelles et tamisage à 2 mm



Homogénéisation de la totalité de l'échantillon par 3 passages successifs au répartiteur *Retsch*



Prélèvement d'une fraction : répartition aléatoire au sous-échantillonneur en 8 fractions « filles » puis broyage à 200µm pour analyse du carbone total et des métaux



Préparation des sols pour analyses et essais de culture

## **B) Obtention d'un sol de référence**

### Normes / Publications utilisées pour la réalisation du protocole

X 31-202 (1986) / ISO 11269-2 : Essais d'inhibition de la croissance des végétaux par une substance

X 31-251 (1994) / ISO 11268-1 :1993 (F) : Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*)

Eom I.C., Rast C., Veber A.M., Vasseur P., 2007 : Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)- contaminated soil, *Ecotoxicological Environmental Safety*, **67**, 190-205.

Leon Morales C.F., Strathmann M., Flemming H.C, 2007: Influence of biofilms on the movement of colloids in porous media, Implications for colloid facilitated transport in subsurface environments, *Water Research*, **41**, 2059-2068.

Matériaux (pour 20kg de sol standard modifié : % Sable = 68,075; % Carbone = 2,585)

11kg Sol standard A3 (46,5% Sable; 2,19% Carbone organique (C.O.); pH 7,2)

8,5kg Sable de quartz (100% sable > 1mm; 0%C.O.; lavé à l'acide chlorhydrique)

500g Sphaignes (Sp) (0% Sable; 95% M.O.; pH 4,5)

### Mode opératoire

Préparation du volume de sphaignes :

Faire sécher 700g de sphaigne sur une paillasse (émietter les mottes au préalable et retourner périodiquement pour accélérer le séchage, environ une nuit à l'étuve 45°C si nécessaire). Broyer puis tamiser à 2mm en ne conservant que les particules vérifiant cette granulométrie.

Préparation du sable de quartz :

Le sable est immergé une nuit dans une solution de HCl à 1M puis lavé à l'eau distillée stérile jusqu'à pH fixe, ajusté si nécessaire avec une solution de NaOH à 0,2M. Sécher le sable jusqu'à masse constante.

Modification du sol A3 :

Homogénéiser manuellement le sol A3, le sable et les sphaignes (proportions A3:S:Sp = 55:42,5:2,5), puis au répartiteur (RETSCH TYP25, 3 passages successifs). Prélever un sous échantillon pour la vérification du pH mesuré dans une solution de KCl à 1M. Ajuster si nécessaire le pH à  $6 \pm 0,5$  par amendements en  $\text{CaCO}_3$ . Procéder à la vérification de la granulométrie, de la teneur en carbone organique total, en azote total, et capacité d'échange cationique.

## **C) Analyse granulométrique par sédimentation : méthode de la pipette (NF X 31-107, AFNOR 1983)**

Trois sous-échantillons des cendres (tamisées à 2 mm) et deux du sol standard modifié sont préparés selon la norme française X 31-107 (AFNOR, 1983). 20 g de prise d'essai sont mis en présence de 100 mL de peroxyde d'hydrogène 1%. Cette procédure a pour but de détruire la matière organique présente dans le sol. A l'arrêt de l'effervescence, la température des échantillons est portée à 70°C. De l'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30%) est alors ajoutée jusqu'à arrêt complet de l'effervescence. Les échantillons sont finalement portés à ébullition pour détruire l'eau oxygénée et réduire le volume de liquide. 10 mL d'une solution d'hexamétaphosphate de sodium (150 g/L) et 5 mL de solution ammoniacale (20 %) sont

ajoutés aux échantillons et leur volume est complété à 300 mL par ajout d'eau distillée. Les flacons sont alors agités (agitateur rotatif Heidolph REAX 20) durant 2 heures. Les échantillons sont ensuite tamisés à 50 µm : les particules retenues sur le tamis sont lavées à l'eau distillée jusqu'à ce que le lixiviat soit limpide. La fraction collectée (< 50 µm) est déposée dans une éprouvette (qsp. 1000 mL avec de l'eau distillée). La fraction « > 50 µm » est récupérée dans une capsule en verre avec un volume minimum d'eau distillée.

Séparation de la fraction grossière (> 50 µm).

La fraction « > 50 µm » est séchée jusqu'à dessiccation complète (105°C; four MEMMERT Modèle 800) puis tamisée à 200 µm. Le résultat du tamisage est récupéré sélectivement dans des coupelles préalablement pesées et identifiés : sables grossiers (SG : particules de diamètre supérieur à 200 µm et inférieur ou égale à 2mm) et sables fins (SF : particules de diamètre supérieur à 50 µm et inférieur ou égal à 200µm).

Le calcul des proportions de chacune des fractions dans la prise d'essai est réalisée selon l'équation :

$$S_x(\%) = \frac{m_{S_x}}{m_p} \times 100$$

où :  $m_{S_x}$  : masse en g de la fraction considérée

$m_p$  : masse en g de la prise d'essai

Séparation des fractions fines (< 50µm).

Les allonges de sédimentation sont homogénéisées par retournements successifs. Les échantillons sont prélevés à la pipette Robinson . Le premier prélèvement correspond aux particules de 0,05mm de diamètre (argiles + limons fins + limons grossiers). Le deuxième concerne les particules de 0,02mm de diamètre (argiles + limons fins) et le dernier rassemble les particules de 0,002mm de diamètre (argiles). Le temps au bout duquel les prélèvements sont réalisés est indiqué dans le tableau « temps de prélèvement à la pipette de Robinson en fonction de la température (°C) et d'une profondeur constante (20cm) » présenté dans la norme. Les temps retenus (température du sol : 22°C) sont de 1'28'' et 9'08'' respectivement. Pour le troisième prélèvement, le tableau « profondeurs des prélèvements à la pipette de Robinson, en fonction de la température (°C) et de temps constants » a permis de définir le temps de prélèvement 6 heures après le début de l'expérience pour une profondeur du prélèvement de 7,9 cm.

Après prélèvement de chaque fraction, les suspensions sont déposées dans des capsules tarées à sec ( $m_x$  en g). Les capsules sont placées au four jusqu'à dessiccation

complète (105°C, four MEMMERT Modèle 800). Après refroidissement et mesure de la masse finale ( $m'x$  en g), la masse de sol séché à 105°C est calculée ( $Mx = mx - m'x$ ).

Les équations suivantes sont employées pour déterminer la proportion des différentes fractions obtenues par prélèvement : limons grossiers (LG : particules de diamètre supérieur à 20  $\mu\text{m}$  et inférieur ou égal à 50  $\mu\text{m}$ ), limons fins (LF : particules de diamètre supérieur à 2  $\mu\text{m}$  et inférieur ou égal à 20  $\mu\text{m}$ ), et argiles (A : particules de diamètre inférieur ou égal à 2  $\mu\text{m}$ ) :

Limon grossier :

$$LG(\%) = (M1 - M2) \frac{1000}{25} \times \frac{100}{m_p}$$

Limon fin :

$$LF(\%) = (M2 - M3) \times \frac{1000}{25} \times \frac{100}{m_p}$$

Argile :

$$A\% = (M3 - S) \frac{1000}{25} \times \frac{100}{m_p}$$

où :  $m_p$  : masse de la prise d'essai (g)

S : masse du dispersant dans 25 mL = 0,04 g

Le contrôle de la qualité de l'analyse granulométrique est finalement effectué selon la méthode bilan :  $\Sigma = SG + SF + LG + LF + A + MO$  (Avec  $95 < \Sigma < 101$ ).

#### **D) Dosage du carbone organique total : Méthode ANNE (NF X 31-109, AFNOR 1993)**

La préparation de l'échantillon, l'évaluation de la quantité nécessaire à la prise d'essai et le type d'oxydation mis en oeuvre (oxydation sulfochromique) suivent les Norme NF X 31-109, AFNOR 1993). La teneur en carbone organique est cependant déterminée à la suite d'un titrage au sel de Mohr, méthodologie inspiré de l'analyse des eaux. 8 échantillons sont préparés dans des ballons de 250 mL en verre nettoyés à l'acide : 1 blanc, 1 « étalon glucose » - 1 mL de prise d'essai, 6 échantillons de cendres (0,1 g de prise d'essai) préalablement broyés à 200 $\mu\text{m}$ . 5 mL de bichromate de potassium (8 %) et 7,5 mL d'acide sulfurique pur sont ajoutés, en respectant l'ordre des réactifs. Les échantillons, reliés à un réfrigérant ascendant, sont portés à ébullition lente (30 min). Les ballons sont retirés et leur contenu transvasé dans des fioles de 100 mL (qsp 100 mL avec de l'eau distillée, plusieurs lavages effectués). Cette solution est diluée au 1/10ème. Chaque échantillon reçoit 1 g de fluorure de

sodium (FNa) et 5 gouttes de diphénylamine. Le titrage est effectué avec une solution de sel de Mohr à 0.2 N (volume équivalent X mL). D'autre part, 5 mL de bichromate de potassium et 7,5 mL d'acide sulfurique (correspondant au blanc) sont titrés avec le sel de Mohr (volume équivalent Y mL).

Le pourcentage de carbone contenu dans le sol est calculé au moyen de la formule :

$$\%C = \frac{(Y - X) \times 0,615 \times 100 \times a}{m_p \times a'}$$

où :  $m_p$  : Poids de la prise d'essai en mg

a : Volume total de la liqueur diluée (100 mL)

a' : Volume de l'aliquote ayant servi au tirage (10 mL)

### **E) Détermination de la teneur en azote total des sols : méthode Kjeldahl (NF ISO 11261, AFNOR 1995)**

Différents échantillons sont préparés : 1 blanc, 1 solution étalon de sulfate d'ammonium (1mL pour la prise d'essai), 1 solution étalon d'acétanilide (1mL pour la prise d'essai) et les échantillons de sol (0,2 g de sol, fraction inférieure à 2mm).

Minéralisation :

Chaque échantillon est placé dans un matras de 50 mL avec 4 mL d'acide salicylique/sulfurique (25 g d'acide salicylique dissous dans 1L d'acide sulfurique concentré). Les matras sont agités puis laissés au repos. 0,5g de thiosulfate de sodium pentahydraté sont ajoutés. L'ensemble est porté à 80°C pendant une heure (augmentation de la température par palier de 5°C/min). Les matras sont ensuite refroidis, et 1,1 g de mélange catalytique est ajouté (sulfate de potassium, sulfate de cuivre pentahydraté et dioxyde de titane). Les échantillons sont alors chauffés (1h30 min à 150°C; rampe de montée en température : 5°C/min; étuve Prodigest VI), avant d'être portés à ébullition (300°C; 1h; rampe de montée en température : 5°C/min). Le lendemain, les échantillons sont réchauffés à 250°C pendant 2h (palier de 5°C/min); la minéralisation étant considérée comme terminée lorsque les premières décolorations apparaissent. 20mL d'eau distillé sont ajoutés après refroidissement à température ambiante.

Distillation :

Les matras sont installés dans l'appareil Kjeldahl (PROLABO), 10mL d'acide borique (20 g/L) sont ajoutés dans une fiole de 100 mL et placé à la sortie du condenseur, de sorte que le tube plonge dans la solution. 20 mL d'hydroxyde de sodium (10 M) sont injectés *via* une pompe. 40 mL de distillat sont finalement collectés après distillation. Les distillats sont alors

titrés avec de l'acide sulfurique (0,01 mol/L) en présence d'indicateur coloré (0,1g de vert de bromocrésol et 0,02g de rouge de méthyle dissous dans 100 mL d'éthanol).

Pour déterminer la teneur total en azote ( $W_N$  en mg/g), la formule suivante est appliquée :

$$W_N = \frac{(V_1 - V_0) \times [H^+]}{m} \times M_N \times \frac{100 + W_{H_2O}}{100}$$

où :  $V_1$  : Volume, en mL, d'acide sulfurique utilisé pour le dosage de l'échantillon

$V_0$  : Volume, en mL, d'acide sulfurique utilisé dans l'essai à blanc

$[H^+]$  : 0,02 mol/L

$M_N$  : Masse molaire de l'azote en g/mol (14 g/mol)

$M$  : Masse, en g, de l'échantillon de sol séché à l'air

$W_{H_2O}$  : teneur pondérale en eau, exprimé en pourcentage en masse (ISO 11465).

#### **F) Détermination de la capacité d'échange cationique (CEC) et des cations extractibles**

Pour déterminer la capacité d'échange cationique du sol, la norme française NF X 31-130 de mai 1993 (AFNOR, 1993) est utilisée. 6 échantillons des cendres et un blanc (prises d'essai : 2,5 g; < 2mm) sont prélevés pour analyse. Les échantillons sont disposés dans des allonges de percolation garnies d'une masse filtrante en fibres de cellulose non contaminants sur une hauteur d'environ 15 mm. Chaque allonge reçoit 30 mL d'acétate d'ammonium à 1 mol/L, et est laissée à percoler durant 1 heure. L'opération est répétée une fois. La fin de la réaction est déterminée par rinçage de l'allonge avec de l'alcool éthylique à 95° jusqu'à absence de réaction au réactif de Nessler.

Mesure de la CEC dans l'acétate d'ammonium percolé.

L'acétate d'ammonium utilisé pour chaque échantillon (60 mL environ) est conservé dans des flacons en verre à -20°C l'analyse ultérieure en spectrophotométrie d'absorption atomique (SPECTRAA 55, Varian) du contenu des cations :

CaO

- o Longueur d'onde : 239,9 nm
- o Intervalle de lecture : 2 - 800 mg/L
- o Gamme : 0 – 100 – 200 – 300 – 400 mg/L

MgO

- o Longueur d'onde : 202,6 nm
- o Intervalle de lecture : 0,15 - 20,00 mg/L
- o Gamme : 0 – 5 – 10 – 15 – 20 mg/L

## K<sub>2</sub>O

- o Mesure en émission
- o Gamme : 0,0 - 2,5 – 5,0 – 10,0 – 15,0 mg/L

## NaO

- o Mesure en émission
- o Gamme : 0,0 - 2,5 – 5,0 – 10,0 – 15,0 mg/L

Après obtention de la concentration des quatre oxydes dans chaque échantillon, la valeur a été rapportée en teneur dans le sol sec (mg/kg) en appliquant la formule suivante :

$$Teneur = \frac{([oxyde] - [Blanc]) * 60}{m_p * W_{dm}}$$

$m_p$  : Masse de la prise d'essai (g)

$W_{dm}$  : Teneur en matière sèche (g)

Or, 1 mole de chaque oxyde apporte 200 cmoles d'ions positifs par litre; le nombre de cmoles+/ kg apportés par chaque oxyde peut donc être calculé à l'aide de la formule :

$$N_c = \frac{[oxyde]}{\left(\frac{M_{oxyde}}{200}\right) * 10^3}$$

$N_c$  : Concentration en oxydes positifs (cmol+/kg de terre)

$M$  : Masse molaire de l'oxyde (g/mol)

Finalement, la somme des teneurs en oxydes positifs exprimée en cmole par kg correspond à la capacité d'échange cationique.

## **G) Extraction des éléments traces métalliques (ETM) solubles dans l'eau régale (NF ISO 11466, AFNOR 1995) - Dosage des ETM par absorption/émission atomique de flamme**

L'analyse est constituée de deux parties : tout d'abord l'extraction des ETM dans l'eau régale puis leur dosage par spectrophotométrie d'absorption / émission atomique de flamme (selon l'élément considéré). Le sol standard pollué WQB-3 (Institut National de Recherche sur les Eaux, 2001) a été utilisé antérieurement pour la mise au point de la méthode d'extraction des éléments en trace du sol au sein du laboratoire.

Extraction des éléments en traces solubles dans l'eau régale :

La méthode suivie pour l'extraction des ETM est celle de la norme française NF ISO 11466 (AFNOR, 1995). La fraction broyée à 200 µm est utilisée pour chacune des 6 prises d'essai (3 g). Chaque échantillon est déposé dans un ballon de 250 mL en verre et humecté par 1 mL d'eau distillée. 21 mL d'acide chlorhydrique (HCl 12 mol/L) et 7 mL d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub> 15,8 mol/L) sont ajoutés. Un blanc (B) contenant uniquement HCl et HNO<sub>3</sub> est préparé de la même manière. Les ballons sont laissés au repos 16h à température ambiante pour l'entame de l'oxydation de la matière organique. Les échantillons sont ensuite portés 2 h à ébullition. Après refroidissement, les réfrigérants à reflux reliés à chaque ballon sont rincés par 10 mL de HNO<sub>3</sub> à 0,5 mol/L et les produits de lavage ajoutés à leur contenu. Chaque échantillon est filtré (WHATMAN filter paper), les volumes ajustés à 100 mL (eau distillée qsp.).

Dosage des ETM par spectrophotométrie d'absorption/émission atomique :

Les dosages sont réalisés au moyen d'un spectrophotomètre à absorption atomique (SPECTRAA 55 - Varian) suite à l'extraction dans l'eau régale. Les longueurs d'onde de détection sont choisies en fonction des teneurs attendues, dans 3 g de sol minéralisé, pour chaque métal analysé (arrêté du 8 de janvier 1998, Ministère d'Agriculture de la République Française).

Exemple : Cadmium (Cd) :

- o Longueur d'onde : 228,8 nm
- o Intervalle de lecture : 0,02 - 3,00 mg/L
- o Gamme : 0 – 5 – 20 – 50 µg/L

Après mesure de la concentration en métaux dans les solutions analysés, la valeur obtenue est reportée en teneur dans le sol sec (mg/kg) en appliquant la formule suivante :

$$[ETM] = \frac{([ETM] - [Blanc]) * 100 * d}{m_p * W_{dm}}$$

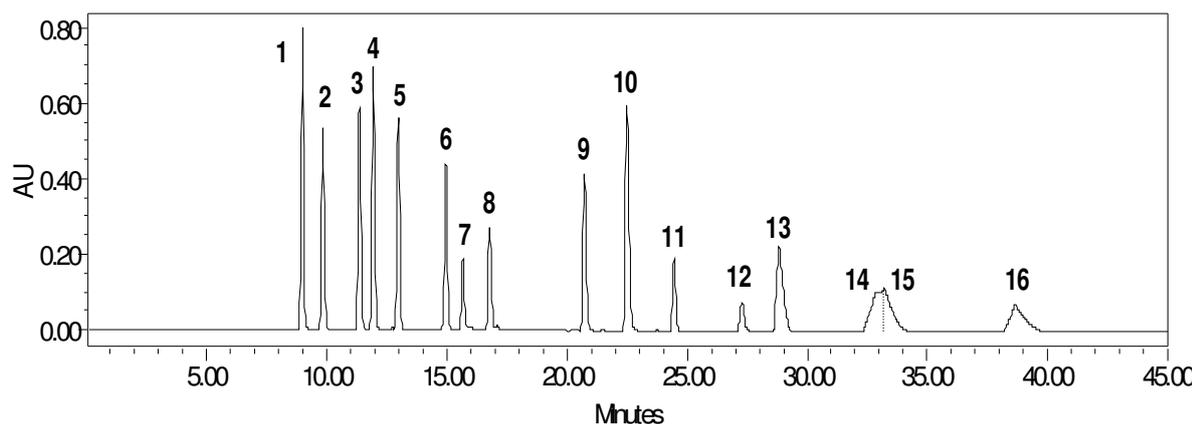
d : facteur de dilution

m<sub>p</sub> : masse de la prise d'essai (g)

W<sub>dm</sub> : teneur en matière sèche (g)

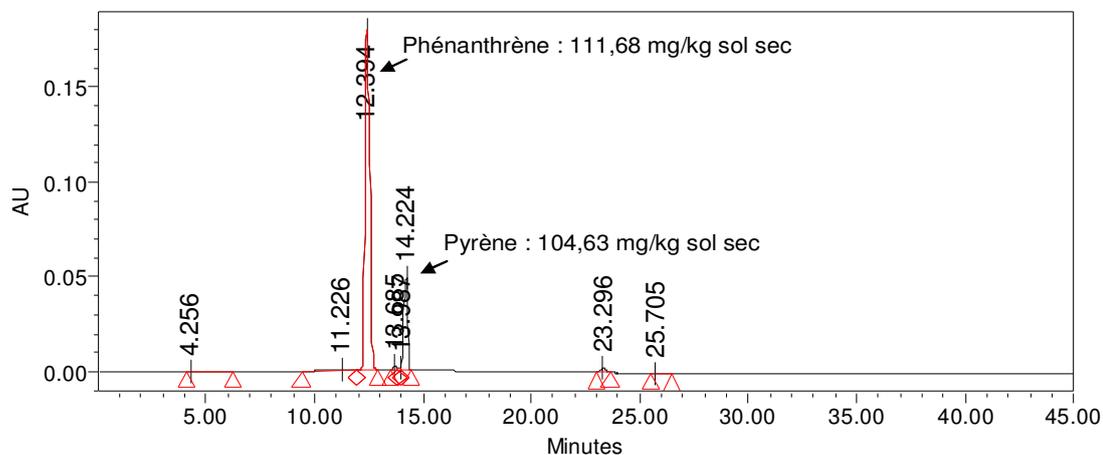
## H) Dosage des HAP

- Exemple de chromatogramme obtenu après injection du standard 16 HAP – USEPA selon les conditions opératoires décrites en Matériels et méthodes (II.2.3.1) :

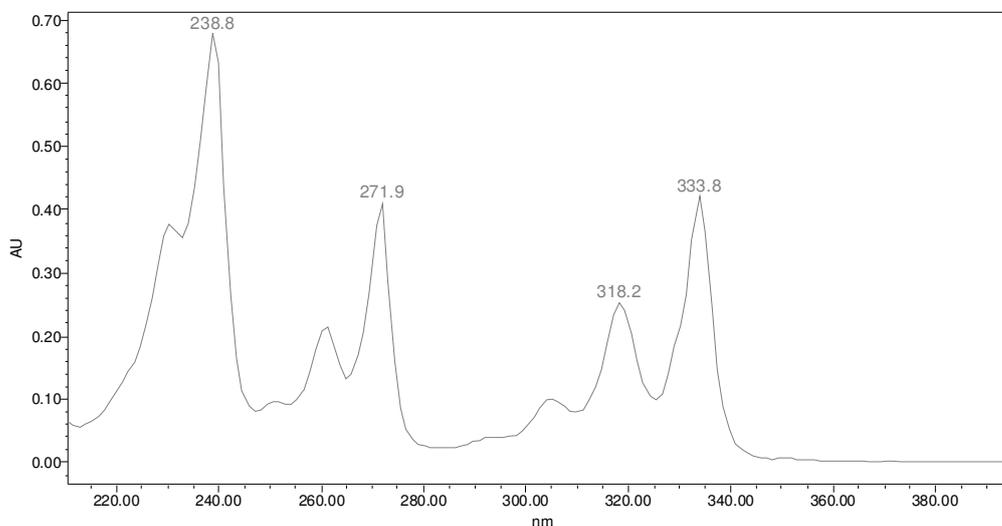


Position d'élution	HAP	Standard (µg/ml)
1	Naphtalène	250
2	Acénaphtylène	250
3	Acénaphène	500
4	Fluorène	50
5	Phénanthrène	20
6	Anthracène	10
7	Fluoranthène	25
8	Pyrène	50
9	Benzo[a]anthracène	25
10	Chrysène	25
11	Benzo[b]fluoranthène	10
12	Benzo[k]fluoranthène	10
13	Benzo[a]pyrène	25
14	Dibenzo[a,h]anthracène	10
15	Benzo[ghi]pérylène	40
16	Indéno[1,2,3-cd]pyrène	25

- Exemple de chromatogramme obtenu après extraction des HAP au soxhlet sur le sol A3 (PE1, dopé en phénanthrène et en pyrène à 100 mg/kg sol sec) selon les conditions opératoires décrites en Matériels et méthodes (II.2.3.1) :



- Exemple de spectre d'absorption UV d'un HAP : le pyrène (spectres obtenus grâce aux mesures d'absorbances réalisées par *PhotoDiodeArray* (PDA) et utilisés dans la reconnaissance des molécules sur chromatogramme)



#### ANNEXE 6 : Concentrations en HAP dans les sols de friche d'après l'ESR de 2005 (BASOL, 2005)

HAP détectés (nombre de cycles)	Concentration dans les sols (mg/kg sol sec)		
	Fond géochimique	ESR* zone « H »	ESR* zone « M »
Acénaphylène (3)	-	< 1,5	< 1,5
Acénaphène (3)	-	< 2	< 0,2
Fluorène (3)	-	< 76	< 19
Phénanthrène (3)	-	< 4	< 1
Anthracène (3)	-	< 9	< 2
Fluoranthène (4)	0,33	< 30	< 9
Pyrène (4)	-	< 65	< 16
Benzo(a)anthracène (4)	-	< 35	< 9
Chrysène (4)	-	< 5	< 9
Benzo(b)fluoranthène (4)	0,17	< 35	< 10
Benzo(k)fluoranthène (4)	0,1	< 21	< 6
Benzo(a)pyrène (5)	0,09	< 38	< 12
Dibenzo(a,h)anthracène (5)	-	< 2	< 1
Benzo(g,h,i)pérylène (5)	0,18	< 30	< 9
Indéno(1,2,3,cd)pyrène (6)	0,17	< 1,5	< 1
<b>Somme des HAP</b>	<b>1,04</b>	<b>&lt; 355</b>	<b>&lt; 105</b>

\* : limites supérieures répertoriées dans la zone d'échantillonnage d'après l'évaluation simplifiée des risques réalisée en 2005 (BASOL).

## ANNEXE 7 : Identification mycologique

Suite à la visite d'une culture de MxG en champ agricole réalisé par le Lycée Public Agricole de Metz Courcelles-Chaussy (23-10-2007), avec qui nous travaillons en collaboration notamment pour l'obtention de rhizomes, des prélèvements de tiges et de feuilles ont été effectués pour une identification mycologique. Une fusariose avait en effet été suspectée pour certains plants dont les rhizomes ont donc la même origine que ceux utilisés pour le plan d'expérience lancé avec le sol standard A3 au laboratoire. La mise en culture de fragments de feuilles de *Miscanthus x giganteus* sur milieu gélosé spécifique (milieu saboureau chloramphénicol) a permis d'isoler deux champignons. Aucune croissance n'a été constatée après ensemencement à partir de fragments de l'intérieur de la tige. L'observation microscopique, réalisée après coloration au bleu de méthylène et lugol, puis montage entre lames et lamelles, a permis d'identifier : *Alternaria* sp. et *Echinobotryum* sp. (affiliation possible avec *Wardomyces* sp.). Ces champignons appartiennent à des genres cosmopolites ubiquistes; aucune fusariose n'a été décelée.

**ANNEXE 8 : Récapitulatif des mesures effectuées sur la friche du Carreau Wendel (Moselle est) après un an de culture de MxG** (*Ex t<sub>+1an</sub>* : prélèvement de sol effectué à 1 m des rhizomes; *Mx t<sub>+1an</sub>* : prélèvement effectué à proximité des racines de MxG; *n.d.* : non déterminé; *n* = 5).

	<b>Forbach t0</b>	<b>Ex t<sub>+1an</sub></b>	<b>Mx t<sub>+1an</sub></b>
<b>C organique total % (méthode ANNE)</b>	12,8 ± 2,01	12,3 ± 3,03	11,5 ± 2,10
<b>texture</b>	sableux		
<b>calcium (CaO, mg/kg)</b>	1066 ± 65	910 ± 357	607 ± 446
<b>magnésium (MgO, mg/kg)</b>	336 ± 24	348 ± 239	199 ± 126
<b>potassium (K<sub>2</sub>O, mg/kg)</b>	142 ± 7	123 ± 44	91 ± 31
<b>Sodium (NaO, mg/kg)</b>	<i>n.d.</i>	52 ± 48	6,5 ± 6,3
<b>Métaux (mg/kg)</b>			
<b>Cr</b>	16 ± 2	15 ± 6	17 ± 7
<b>Cu</b>	48 ± 0,5	42 ± 15	40 ± 21
<b>Ni</b>	53 ± 1	45 ± 15	44 ± 16
<b>Co</b>	15 ± 1	12 ± 4	13 ± 5
<b>Zn</b>	126 ± 3	89 ± 6	89 ± 13
<b>Pb</b>	<i>n.d.</i>	42 ± 17	42 ± 17

## **Résumé :**

L'objectif de cette thèse a été d'évaluer les possibilités de réhabilitation de sols dégradés, contaminés par des HAP ou à faible qualité agronomique (parc à cendres volantes), en couplant la bioremédiation de ces sols à la culture de *Miscanthus x giganteus* (MxG). Dans un premier temps, la mise au point d'une série de bioessais *in vitro* au format microplaque a permis de témoigner de la contribution spécifique des exsudats racinaires de MxG et plus particulièrement de la quercétine (identifié parmi les métabolites secondaires racinaires) dans la biostimulation de bactéries HAP-dégradantes. Afin d'appréhender l'effet rhizosphérique de MxG sur la qualité des sols, des cultures en microcosmes de sols reconstitués puis de sols de friches ont été menées en laboratoire. D'une part, la dissipation significative des HAP à 4 cycles a pu être mesurée dans le compartiment racinaire des sols contaminés. D'autre part, l'augmentation des teneurs en carbone organique observée dans les cendres volantes, associée à une dynamisation du cycle de l'azote suggèrent une accélération des processus pédogénétiques liés au « vieillissement » du substrat. En outre, le développement d'un protocole d'extraction et de purification d'acides nucléiques a permis de suivre l'évolution de la diversité des communautés bactériennes des sols par méthode PCR-TTGE des ADNr 16S microbiens. La sélection de phylotypes bactériens a été mise en évidence au niveau rhizosphérique, en particulier à l'interface sol-racine (rhizoplan), soulignant l'influence de processus racinaires sur la structuration des communautés bactériennes *in vivo*. Enfin, un dernier volet, rendant compte d'expériences exploratoires sur deux saisons de croissance en champs (sols pollués et parc à cendres), a permis de confirmer l'adaptation de MxG à la variété de substrats étudiés, suggérant que sa culture pourrait constituer une alternative d'agriculture durable sur sites contaminés.

**Mots-clés :** phytoremédiation, revégétalisation, *Miscanthus x giganteus*, bactéries du sol, biodégradation des HAP, flavonoïdes, cendres volantes.

## **Abstract:**

The aim of this work was to investigate the potential of *Miscanthus x giganteus* (MxG) for PAH polluted soils remediation and fly ash revegetation. *In vitro* studies through microplate assays demonstrated the contribution of MxG root exudates and particularly of quercetin (following the identification of root secondary metabolites) to the selective biostimulation of PAH-degrading bacteria. To get insights into bioremediation processes and rhizosphere effects on soil quality, microcosm experiments were conducted at a laboratory scale, using artificially reconstituted soils and collected industrial soils. On the one hand, significant dissipations of four-ring PAH were noticed in the rhizosphere of contaminated soils. On the other hand, significant organic carbon and nitrite inputs could be measured in fly ash, indicating a "restart" of nitrogen cycle and suggesting an enhancement of fly ash weathering processes in the long term. Besides, the development of a soil nucleic acid extraction and purification method permitted to study the evolution of bacterial community diversity in all types of soils, based on PCR-TTGE of eubacterial 16S rDNA. Specific enrichments of bacterial phylotypes could be reported in rhizoplanes, confirming root-associated processes on the selection of soil bacterial communities. Finally, plant adaptation to the broad range of studied substrates *in situ* lead us to suggest that MxG cultivation could be an effective strategy for a new system of sustainable agricultural activities in wasteland soils.

**Keywords:** phytoremediation, *Miscanthus x giganteus*, soil bacteria, PAH biodegradation, flavonoids, fly ash revegetation.