



HAL
open science

Phytoremédiation appliquée au traitement de sols contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques

Pascal Henner

► **To cite this version:**

Pascal Henner. Phytoremédiation appliquée au traitement de sols contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2000. Français. NNT : 2000INPLI33N . tel-01750425

HAL Id: tel-01750425

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750425>

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

00 INPL 133N

Institut National Polytechnique de Lorraine
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Ecole Doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement
Laboratoire Sols et Environnement ENSAIA-INRA

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du titre de Docteur de l'INPL
Spécialité : Sciences Agronomiques

**Phytoremédiation appliquée au traitement de sols contaminés
par des hydrocarbures aromatiques polycycliques**

par

Pascale HENNER

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

Soutenue publiquement le 20 Décembre 2000 devant la commission d'examen :

André AMBLES , Professeur, Université de Poitiers	Rapporteur
Jean OUDOT , Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle	Rapporteur
Jérôme GUEZOU , Gaz de France	Examineur
Jean-I A-INRA Vandoeuvre	Examineur
Frédér	Examineur
Patrici té Grenoble I	Examineur
Michel SCHIAVON , Professeur, ENSAIA-INRA Vandoeuvre	Directeur de thèse



Institut National Polytechnique de Lorraine
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Ecole Doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement
Laboratoire Sols et Environnement ENSAIA-INRA

Thèse [H] 2000 HENNER, P.

Présentée en vue de l'obtention du titre de Docteur de l'INPL
Spécialité : Sciences Agronomiques

Phytoremédiation appliquée au traitement de sols contaminés
par des hydrocarbures aromatiques polycycliques

par
Pascale HENNER

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

Soutenue publiquement le 20 Décembre 2000 devant la commission d'examen :

André AMBLES , Professeur, Université de Poitiers	Rapporteur
Jean OUDOT , Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle	Rapporteur
Jérôme GUEZOU , Gaz de France	Examinateur
Jean-Louis MOREL , Professeur, ENSAIA-INRA Vandoeuvre	Examinateur
Frédéric PERIE , Docteur, TotalFinaElf	Examinateur
Patrick RAVANEL , Professeur, Université Grenoble I	Examinateur
Michel SCHIAVON , Professeur, ENSAIA-INRA Vandoeuvre	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Michel SCHIAVON pour avoir dirigé mes travaux de thèse. Son aide, sa constante disponibilité et ses conseils avisés m'ont permis de progresser tout au long de ces trois ans et de mener à bien mes recherches. A son contact, j'ai ainsi beaucoup appris, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Qu'il en soit vivement remercié.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur Jean-Louis MOREL, directeur du laboratoire Sols et Environnement de l'ENSAIA pour m'avoir fait confiance et m'avoir confié ce travail de recherche. Ces nombreuses remarques ont largement contribué à la mise en œuvre de ce travail. Je le remercie également pour sa participation à mon jury de thèse.

Mes remerciements vont ensuite à Messieurs Vincent DRUELLE et Jérôme GUEZOU ainsi que Madame Marie GIORDANA de la Direction de la Recherche de Gaz de France, ainsi qu'à Messieurs Alain PEREZ Frédéric PERIE de la société TotalFinaElf, pour avoir contribué à guider cette recherche. Leur aide constante, leurs remarques avisées et leurs encouragements m'ont été d'une aide précieuse. Je remercie de plus Jérôme GUEZOU et Frédéric PERIE d'avoir bien voulu faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examinateurs.

Je remercie vivement Messieurs André AMBLES, Professeur à l'Université de Poitiers et Jean OUDOT, Professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle, de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie également Monsieur Patrick RAVANEL de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse en tant qu'examinateur.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur Eric LICHTFOUSE pour m'avoir aidée, au cours de ces trois années de recherche, par ses critiques toujours constructives et ses conseils tant au niveau scientifique qu'humain, à construire ma réflexion et à conduire mon travail de la réalisation des expériences jusqu'à la rédaction de ce mémoire. Je le remercie aussi tout particulièrement pour m'avoir initiée aux arcanes, passionnantes, de la géochimie organique et de ces techniques, et pour son apport inestimable en dehors du strict travail de thèse.

J'exprime ensuite toute ma reconnaissance à tous les membres du laboratoire Sols et Environnement pour leur aide si précieuse : Bernard et Stéphane COLIN ainsi que Louis FLORENTIN pour leur sérieux, leur bonne humeur et leur humour lors de la réalisation des travaux de terrain et la mise au point des dispositifs expérimentaux , Christophe SCHWARTZ pour ses conseils, Denis VEIN pour ses connaissances illimitées en botanique, Madeleine LEROUVILLOIS et Nicole JOLAIN pour leur disponibilité et leur sourire.

Mes remerciements vont ensuite aux personnels de Gaz de France qui m'ont aidé à divers stades de ma thèse : Mademoiselle Adeline REBOIS et Madame Jeanne-Marie COSTES, de la Direction de la Recherche, Messieurs DEMOULIN, HUA et TEXIER de la Direction Immobilière, ainsi que Messieurs BEAUGUITTE, HINSBERGER, GUENE et GRIVOT au niveau de directions régionales de Gaz de France.

Je remercie vivement Sonia HENRY pour son aide inestimable et son travail remarquable, ainsi que sa constante bonne humeur.

Mes remerciements vont ensuite à tous ceux qui ont contribué par leur amitié et leurs commentaires à maintenir cette bonne ambiance de jeunes qui travaillent particulièrement stimulante : Agathe, Alain, Carine B, Carine S, Catherine, Cécile, Christos, Fatma, Géraldine, Karen, Nicolas, Richard, Salem, Sandra, Sébastien, Tina.

Je remercie aussi tout particulièrement Claire, Sophie et son black minou, Frédo et Marie pour tous les fou- rires, les bals folks et les bains de mer en plein hiver que nous avons partagé.

Je ne pourrai finir sans remercier toute ma famille qui a su m'épauler, m'encourager et maintenir mon moral au beau fixe pendant ces trois années. Je remercie ainsi tout particulièrement mes parents, mon frère et ma petite cousine Marie.

Table des matières

Introduction générale.....	7
Chapitre 1 : Développement de végétaux sur diverses matrices en présence de HAP.....	12
1. Introduction.....	12
2. Etude bibliographique.....	13
2.1. Tests de phytotoxicité	
2.2. Réponse de la plante à la présence de HAP	
2.3. Conclusions	
3. Matériels et Méthodes.....	18
3.1. Les terres	
3.2. Les produits	
3.3. Les espèces végétales	
3.4. Méthodologie d'analyse des HAP dans un échantillon de sol	
3.5. Méthodologie des tests culturaux	
3.6. Etude du développement racinaire d'une graminée en présence de terre d'AUG	
4. Résultats et discussion.....	32
4.1. Etude de la germination de différentes espèces végétales en présence de matrices contenant des HAP	
4.2. Effet de différentes matrices contenant des HAP sur la croissance des espèces végétales	
4.3. Etude du développement du système racinaire du ray-grass en présence de terres de site d'ancienne usine à gaz	
5. Conclusions.....	60
Chapitre 2 : Etude du transfert des HAP vers les végétaux.....	62
1. Introduction	62
2. Etude bibliographique.....	62
2.1. Absorption d'eau et de solutés par les végétaux	
2.2. Barrières végétales : conséquences sur les possibilités de pénétration et de mobilité des HAP dans la plante	
2.3. Absorption racinaire de molécules organiques et de HAP	
2.4. Transfert de molécules organiques et de HAP des racines vers les parties aériennes	
2.5. Passage de molécules organiques et de HAP dans la plante à partir des feuilles	

2.6. Devenir des molécules xénobiotiques et des HAP dans la plante	
2.7. Conclusions	
3. Matériels et Méthodes.....	76
3.1. Matériels	
3.2. Transfert de phénanthrène et de benzo[a]pyrène marqué d'une solution nutritive vers les plants de maïs	
3.3. Identification et quantification de phénanthrène marqué au deutérium dans les parties aériennes du maïs	
3.4. Transfert de HAP en présence de sol en chambre de culture	
3.5. Transfert de phénanthrène et de benzo[a]pyrène en présence de sol en enceinte fermée	
4. Resultats et discussion.....	83
4.1. Transfert de HAP à partir de solutions nutritives vers les parties aériennes de plants de maïs	
4.2. Influence du sol sur le transfert de HAP vers les parties aériennes de plants de maïs	
5. Conclusions.....	99

Chapitre 3 : Dissipation des HAP dans différents sols - Approche modélisée en conditions contrôlées et naturelles.....	101
1. Introduction.....	101
2. Etude bibliographique.....	101
2.1. Devenir des polluants organiques dans le sol	
2.2. Rétention des polluants organiques dans le sol : conséquences sur la disponibilité et la biodisponibilité	
2.3. Transport des polluants organiques vers les eaux de surface ou les eaux souterraines	
2.4. Biodégradation des HAP dans le sol	
2.5. Effet rhizosphère et conséquences potentielles sur la biodégradation des HAP	
2.6. Phytoremédiation de molécules organiques et des HAP	
2.7. Conclusions	
3. Matériels et Méthodes.....	116
3.1. Matériels	
3.2. Analyse des terres rhizosphériques et non rhizosphériques d'un site d'ancienne usine à gaz	
3.3. Etude du devenir des HAP dans la rhizosphère de graminées en vases de végétation de volume réduit et en colonnes de sol	
3.4. Réalisation d'un dispositif pilote : les lysimètres	
4. Résultats et discussion.....	129

4.1. Teneur en HAP de terres rhizosphériques et non rhizosphériques d'un site d'ancienne usine à gaz	
4.2. Dissipation des HAP dans la rhizosphère de graminées cultivées en vases de végétation	
4.3. Etude du devenir des HAP d'une terre d'ancienne usine à gaz en colonnes de sol	
4.4. Etude du devenir des HAP dans un système pilote de lysimètres	
5. Conclusions.....	159
Conclusion générale.....	161
Références bibliographiques.....	166
Annexe	179
Liste des figures.....	182
Liste des tableaux.....	185
Liste des photographies.....	187

Introduction générale

La première usine à gaz recensée en Europe a été construite en 1812 en Angleterre par la "London and Westminster Chartered Gas, Light and Coke Company" (Srivastava *et al.*, 1994). En France, les divers procédés mis en œuvre dans les usines à gaz et les cokeries ont fonctionné de la fin du 19^{ème} siècle jusqu'en 1971, date de fermeture de la dernière usine encore en activité.

Le procédé employé dans la majorité des usines est celui de la pyrogénéation de la houille à haute température (600-800°C). Les diverses étapes de production et de purification du gaz génèrent des sous-produits dont bon nombre de composés constitutifs sont inscrits sur la liste des polluants prioritaires de l'EPA (Agence américaine de Protection de l'Environnement). Ces composés appartiennent à cinq classes de molécules: les composés inorganiques, les métaux, les composés aromatiques volatils (benzène, toluène, xylènes,...), les composés phénoliques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Au cours de la phase d'activité des usines à gaz, les sous-produits étaient valorisés, au niveau des filières de l'industrie chimique en particulier. Ainsi, les goudrons étaient utilisés pour le traitement des bois de charpente, pour le goudronnage des routes ainsi que pour la fabrication de colorants et de solvants (Vercamer *et al.*, 1996). Au démantèlement des usines, des quantités variables de goudrons et autres sous-produits sont restées dans des cuves de stockage et ont pu, à la faveur d'une altération de leurs parois, provoquer des contaminations importantes du sol. Cette contamination s'ajoute à celle, accidentelle ou chronique, résultant de l'absence de législation environnementale à cette époque et de l'inexistence de connaissances relatives au risque découlant de l'utilisation de ces substances.

Il existe ainsi, en France, plus de 800 sites ayant accueilli, au cours des 19^{ème} et 20^{ème} siècles, des usines de production de gaz de ville. Une bonne partie de ces sites présente une contamination des sols plus ou moins forte par les goudrons et les HAP.

Les HAP sont des molécules représentées par des cycles benzéniques (Figure 1). Ces molécules sont pour la plupart peu hydrosolubles, peu volatiles et très lipophiles (Tableau 1).

Certains HAP sont, de plus, suspectés avoir des propriétés mutagènes et cancérigènes. Ces propriétés sont dans certains cas avérées, comme pour le benzo[a]pyrène. L'élimination des HAP est, de ce fait, considérée comme nécessaire lors de la mise en œuvre de processus de réhabilitation des sols de ces friches industrielles.

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des 16 HAP EPA (d'après MacKay *et al.*, 1991).
 ND, non disponible; Kow : coefficient de partage octanol-eau; Koc : coefficient d'adsorption
 aux matières organiques.

Composé	Nombre de cycles	Masse moléculaire	Solubilité dans l'eau (µg/l à 25°C)	Pression de vapeur (mPa à 25°C)	Log Kow	Log Koc	Demi-vie dans le sol (j)
Naphtalène	2	128,2	31000	10400	3,37	ND	70,8
Acénaphthène	3	154,2	3800	300	3,92	3,67	ND
Acénaphthylène	3	152,2	3930	890	4,06	3,50	229,2
Fluorène	3	166,2	1980	130	4,18	4,15	229,2
Phénanthrène	3	178,2	1210	20	4,50	4,28	229,2
Anthracène	3	178,2	75	1,25	4,45	4,24	229,2
Fluoranthène	4	202,3	250	64	5,20	4,65	708,3
Pyrène	4	202,3	130	0,9	4,88	4,81	708,3
Benzo(a)anthracène	4	228,3	13	0,0271	5,70	5,66	708,3
Chrysène	4	228,2	3,6	0,00057	5,61	4,89	708,3
Benzo(b)fluoranthène	5	252,3	1,5	0,0212	6,50	5,70	708,3
Benzo(k)fluoranthène	5	252,3	0,81	0,0207	6,80	5,92	708,3
Benzo(a)pyrène	5	252,3	0,38	0,00073	6,31	6,06	708,3
Indéno(123-cd)pyrène	6	276,3	0,26	0,000014	7,20	ND	ND
Benzo(ghi)pérylène	6	276,3	0,05	0,0000026	ND	ND	ND
Dibenzo(ah)anthracène	5	278,4	0,6	0,000013	6,50	6,06	708,3

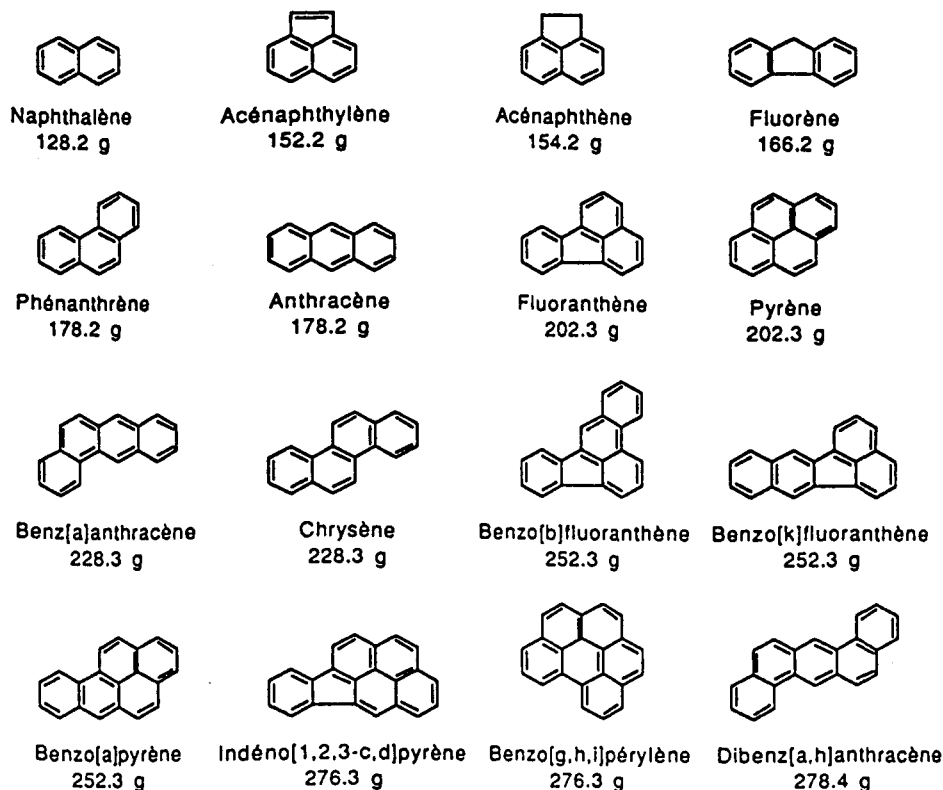


Figure 1 : Formule chimique et masse moléculaire des 16 HAP sélectionnés par l'Agence américaine de Protection de l'Environnement (EPA) comme polluants prioritaires pour leur étude et leur élimination de l'environnement.

Les procédés de traitement des sols contaminés sont de nature physico-chimique ou biologique. Le choix d'une ou plusieurs méthodes de traitement dépend de paramètres relatifs au site, au matériau à traiter et aux objectifs de la réhabilitation. Dans le cas de sites de taille réduite avec de petites quantités de matériaux fortement contaminés, les méthodes biologiques sont le plus souvent délaissées au profit des méthodes thermiques comme la désorption thermique. Ces méthodes sont efficaces et rapides, ce qui permet la mise en place d'unités de traitement mobiles, qui du point de vue légal présentent peu de contraintes. Dans le cas de grandes quantités de matériaux de niveaux de contamination variés, la stratégie de réhabilitation préconise en général l'emploi de plusieurs méthodes, appliquées après un tri des matériaux. Ainsi, les matériaux faiblement contaminés sont plutôt utilisés comme remblais, les matériaux très contaminés, présents en quantités réduites en général, sont traités par désorption thermique soit sur site grâce à une unité mobile, soit hors site. Les matériaux présentant une contamination intermédiaire peuvent faire l'objet d'un bio-traitement.

Les méthodes biologiques font appel à la capacité d'auto épuration du milieu, mise en œuvre de façon volontaire et fortement stimulée par l'apport éventuel de divers nutriments. La phytoremédiation constitue un cas particulier de ces traitements biologiques.

A l'origine, dans le cadre de la réhabilitation des sites, la phytoremédiation a surtout été appliquée au traitement de sols contaminés par des métaux lourds, grâce à l'utilisation d'une flore particulière, dite hyperaccumulatrice, accumulant les métaux dans leur parties aériennes à des concentrations pouvant aller jusqu'à 3% de la masse foliaire sèche (Brooks *et al.*, 1977; Baker, 1981; Baker *et al.*, 1994; Reeves *et al.*, 1996; Schwartz, 1997).

L'utilisation des plantes et de leurs microorganismes associés, appelée phytodégradation, est, dans le cadre général de la phytoremédiation, une nouvelle approche de la bioremédiation des sols contaminés par des produits organiques. Cette méthode consiste à combiner la capacité de certains microorganismes du sol à dégrader les polluants peu biodisponibles et récalcitrants comme les HAP (Atlas, 1991; Kästner *et al.*, 1994; Chaîneau, 1995), et la capacité des plantes à créer un habitat favorable au développement de ces microorganismes au niveau de leurs racines [effet rhizosphère] (Hiltner, 1904). L'utilisation de plantes peut dans cette optique être envisagée postérieurement à la réalisation d'un bio-traitement classique, ou en tant que complément du bio-traitement.

Les premières études de phytotraitement de composés organiques purs, HAP ou non, ont donné des résultats prometteurs (Aprill & Sims, 1990; Lee & Banks, 1993; Chaîneau *et al.*, 1997). Cependant, ceux-ci sont peu nombreux et paraissent difficilement transposables à l'échelle de la friche industrielle et à la réalité d'un sol industriel multi-contaminé, où les

polluants sont restés en contact pendant plusieurs décennies avec les constituants du sol. Les mécanismes et l'efficacité de la phytoremédiation restent donc à mettre en évidence dans le cas de sols du type ancienne usine à gaz.

Gaz de France est encore propriétaire de 467 sites d'anciennes usines à gaz, pour lesquels un plan décennal de réhabilitation a été initié, en partenariat avec le Ministère de l'Environnement français. Parallèlement à ce plan, Gaz de France a engagé des recherches sur la caractérisation et le comportement des matières polluantes présentes sur les sites avec deux objectifs : comment mieux qualifier les risques et mettre au point de nouvelles méthodes de traitement.

L'étude de la faisabilité de la phytoremédiation, qui constitue l'objet des travaux décrits dans ce mémoire, s'inscrit donc dans le cadre de la recherche de nouvelles méthodes de traitement, prenant en compte les problèmes de communication et d'acceptabilité sociale. D'autre part, ces travaux ont pour objectif plus général la compréhension des mécanismes régissant le devenir des HAP dans le système sol-plante.

Quatre paramètres (figure 2) doivent être respectés pour assurer la réussite d'un phytotraitement appliqué aux sols contaminés par des HAP : l'installation de plantes sur les terres contaminées, la colonisation de ces terres par les racines, l'efficacité du système **sol-plante-microorganismes associés** pour décontaminer et l'absence de mobilisation et de transport des polluants vers les eaux ou les plantes.

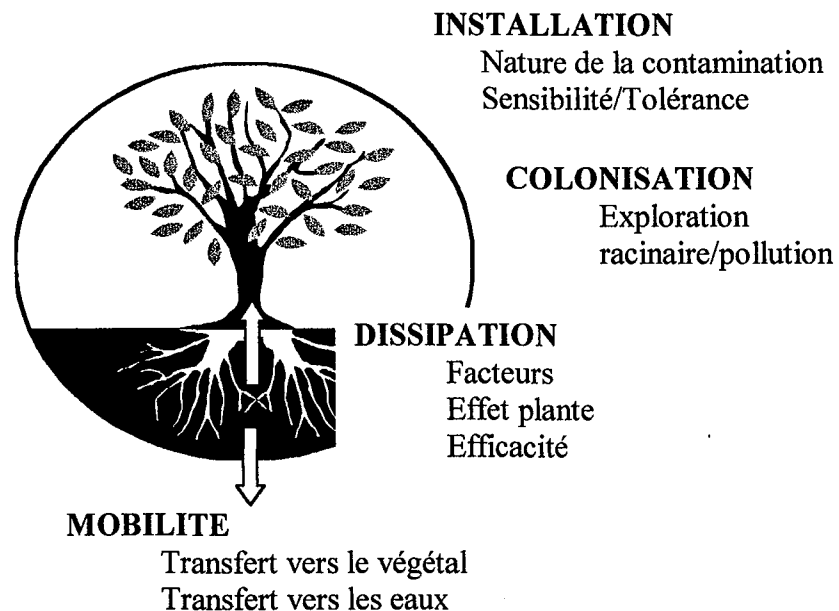


Figure 2 : Conditions gouvernant la mise en œuvre d'un traitement des terres par phytoremédiation.

La colonisation végétale des terres est la condition préalable à la mise en place d'un phytotraitement. L'étude de la phytotoxicité des HAP purs ainsi que des terres et goudrons d'ancienne usine à gaz sur des espèces végétales cultivées et sauvages fait l'objet du chapitre 1. Ces travaux ont pour finalité l'identification de plantes particulièrement tolérantes aux HAP. Le chapitre 1 présente ainsi un ensemble de tests culturaux visant à caractériser la sensibilité des différentes phases de développement des plantes (germination, croissance aérienne et racinaire) aux HAP ainsi que leurs facteurs limitants. L'analyse de la flore présente naturellement sur les sites d'anciennes usines à gaz sert de base à ces études, tant par le choix d'espèces sauvages que par la mise en évidence de mécanismes gouvernant l'expression de la phytotoxicité ou de la tolérance. Les conséquences des résultats de ces tests sur la définition du dispositif de traitement des terres et ses limites seront abordées à la fin de ce chapitre.

Le transfert de HAP du sol vers la plante par les racines ou vers les feuilles en provenance de l'atmosphère constitue un risque éventuel de contamination de la chaîne alimentaire. Dans le cadre de la gestion des risques liés aux polluants, des études de phytoextraction étaient donc nécessaires. De plus, dans le cadre de l'évaluation de la méthode, il est intéressant d'étudier dans quelle mesure la plante participe à la réhabilitation des sols contaminés. L'étude du transfert de HAP vers les parties aériennes des végétaux, conduites à l'aide de molécules marquées, et ses limites fait ainsi l'objet du chapitre 2.

L'influence de la plante sur le devenir des HAP dans le sol est le facteur clé du phytotraitement. Il comporte deux volets : la dissipation des HAP et la mobilisation et/ou le transport par l'eau vers les nappes. Ces deux volets sont ainsi abordés au sein du chapitre 3. Diverses échelles de travail nous ont permis d'envisager ces problématiques sous des angles différents. La première partie du chapitre 3 fait état de la réalisation de dispositifs de laboratoire, de taille réduite, placés en conditions contrôlées. Ces dispositifs optimisés ont permis dans un premier temps de comparer les modalités de la dissipation des HAP dans les terres agricoles artificiellement contaminées et dans les terres d'ancienne usine à gaz. Dans un second temps, la réalisation d'un dispositif pilote de phytotraitement de terres d'ancienne usine à gaz, en conditions climatiques naturelles, a été mis en place. Visant à reproduire les conditions d'un futur traitement des terres par phytoextraction, les ambitions de ce dispositif étaient de synthétiser les données, et de les confronter aux résultats obtenus, soit au laboratoire, soit à partir des observations faites sur les sites.

Synthétisés au niveau de la conclusion générale, l'ensemble des résultats de nos travaux nous a enfin permis d'apprécier la faisabilité de la phytoextraction appliquée aux terres d'anciennes usines à gaz.

Chapitre 1 : Développement de végétaux sur diverses matrices en présence de HAP

1. INTRODUCTION

L'implantation de plantes sur un sol de friche industrielle en attente de requalification présente deux avantages principaux. Le premier est lié aux propriétés de stabilisation des couches superficielles du sol résultant de la colonisation par les racines (phytostabilisation). La présence de plantes limite ainsi l'érosion par l'eau ou le vent de matériaux contaminés et leur transfert vers d'autres zones non contaminées. Le second est lié à la présence, au niveau de la rhizosphère, d'une communauté de microorganismes très active. Ces plantes pourraient donc aider à la dégradation *in-situ* des polluants organiques comme les HAP (phytodégradation).

Les sols des sites d'anciennes usines à gaz contiennent divers polluants, au nombre desquels les HAP. Or, certains de ces polluants ont des propriétés phytotoxiques reconnues. Ainsi, certains hydrocarbures ont été utilisés en agriculture vers les années 1960 pour leurs propriétés herbicides et insecticides (Currier, 1954; Havis, 1949; Ivens, 1952).

Les HAP sont les composés constitutifs majoritaires des goudrons à l'origine de la contamination des sols des sites d'anciennes usines à gaz. Ces molécules ne sont en général pas considérées comme étant phytotoxiques dans la littérature au contraire des molécules volatiles mono-aromatiques de type benzène, elles aussi identifiées dans ces terres. La présence d'une végétation parfois très abondante sur les sites d'anciennes usines à gaz (photographie 1), y compris dans des zones où la teneur en HAP est élevée, semble démontrer l'absence de phytotoxicité apparente du substrat. Cependant, cette absence de phytotoxicité pourrait être réelle ou résulter du comportement particulier des espèces végétales qui se sont développées sur le site

Un des objectifs de ce chapitre a donc été l'étude de la germination, puis de la croissance de diverses espèces végétales sur des terres d'ancienne usine à gaz, afin d'en étudier la réponse comportementale face à la présence d'une contamination. Les espèces végétales les plus fréquemment identifiées sur les sites ont été utilisées pour ces tests, dans la mesure où la disponibilité commerciale de leurs semences le permettait. Parallèlement, des espèces végétales de grande culture ont été testées, car la maîtrise de leur cycle de développement et la disponibilité commerciale de leurs semences en faisaient a priori de meilleures «candidates» pour la mise en place d'un phytotraitement à grande échelle.



Photographie 1 : Vue de la végétation sur un site d'ancienne usine à gaz.

Les effets de quatre matrices (terre d'ancienne usine à gaz, goudron, fraction volatile du goudron et HAP purs) sur le développement des végétaux ont été étudiés, dans le but de qualifier les propriétés de phytotoxicité de ces différents milieux.

De plus, les végétaux présents sur les sols contaminés par les HAP ont comme autre caractéristique l'obligation de se développer en interaction avec une contamination hétérogène du point de vue de sa répartition spatiale, tant quantitative que qualitative. Dans un second temps, la colonisation racinaire des matériaux en relation avec, d'une part leur teneur en HAP, et, d'autre part, leur localisation, a donc été examinée.

2. Etude bibliographique

L'évaluation des propriétés d'écotoxicité d'une substance en général, et des HAP en particulier, est réalisée grâce à de nombreux tests normalisés (Bücker *et al.*, 1979; Nisbet & Lagoy, 1992; Sims & Overcash, 1983). Ces tests sont basés principalement sur l'observation et la quantification des effets des HAP sur des matériels aussi divers que des microorganismes, des cellules isolées ou des organismes animaux entiers (Bücker *et al.*, 1979; White, 1986; Hyzy & Schepart, 1995). Si les effets des HAP sur ces divers modèles sont

relativement bien décrits dans la littérature, les études relatives à l'effet des HAP, en tant que molécules isolées en particulier, sur des modèles végétaux sont pratiquement inexistantes.

Ainsi, dans ce paragraphe, les différents types de tests permettant d'évaluer la phytotoxicité des HAP seront brièvement rappelés. Puis, les trois composantes identifiées de l'effet des HAP sur le végétal seront détaillées :

- l'effet de type hormonal de certains HAP sur la croissance et le développement cellulaire d'algues et de végétaux supérieurs,
- l'effet des radiations ultraviolettes sur la phytotoxicité induite des HAP, ainsi que
- la phytotoxicité directe de certains HAP.

2.1. Tests de phytotoxicité

La phytotoxicité des HAP peut être évaluée grâce à la mise en place de tests non spécifiques dont certains sont normalisés. Trois types de tests sont couramment mis en œuvre :

- les tests de développement : ces tests normalisés étudient l'inhibition de la germination (AFNOR X31-201), de la croissance (AFNOR X31-202) ou de l'élongation racinaire (AFNOR X31-203) en présence de concentrations croissantes de substances données,
- les tests basés sur l'observation de symptômes, par exemple des chloroses au niveau des feuilles, et la mesure de leur intensité,
- les tests basés sur la mesure de l'inhibition d'un phénomène métabolique en présence de la substance supposée phytotoxique. Les phénomènes les plus étudiés sont relatifs aux processus conduisant à la production de biomasse : photosynthèse et fixation de l'azote atmosphérique par les espèces légumineuses.

Le test de germination, dont la durée est courte, permet d'évaluer une toxicité aiguë, quasi instantanée suite au contact avec la substance testée. Le test de croissance et le test d'élongation racinaire permettent d'évaluer une toxicité chronique, résultante d'un ensemble d'effets cumulés sur une période plus longue. Si le test de germination est largement utilisé, le test de croissance, et secondairement le test d'élongation racinaire, sont cependant plus pertinents pour étudier la phytotoxicité d'une substance. En effet, la phase de germination est une étape du développement végétal au cours de laquelle la plantule puise dans les réserves de la graine. Les échanges avec le sol sont donc plus limités que dans les phases ultérieures de la croissance, où l'acquisition des éléments nécessaires à la constitution des tissus, ainsi que, potentiellement, les substances phytotoxiques qui s'y trouvent, sont puisés uniquement dans le sol et l'atmosphère.

2.2. Réponse de la plante à la présence de HAP

Les données bibliographiques existantes montrent que la plante réagit à l'addition de HAP dans son milieu de croissance. Cependant, cette réponse n'est pas généralisable. En effet, dans certains cas, les HAP semblent se comporter comme des hormones végétales en stimulant le développement végétal. Dans d'autres cas, les HAP inhibent ce développement, soit par action directe, soit après induction par les radiations solaires en particulier.

2.2.1. Stimulation du développement de végétaux par les HAP

Les HAP semblent dans certains cas stimuler la croissance et induire une augmentation du rendement des plantes inférieures et supérieures (Gräf, 1965; Gräf & Nowak, 1966). Ainsi, les travaux de Gräf (1965) ont montré qu'après arrosage journalier de cultures par une solution aqueuse de benzo[a]pyrène à la concentration de $10 \mu\text{g l}^{-1}$, le rendement de plants de chou-rave (*Brassica* spp.) augmente de 20% par rapport au témoin, celui du chou-fleur (*Brassica* spp.) de 20%, celui du riz (*Secale cereale* L.) de 300% et celui du tabac (*Nicotiana tabacum* L.) de 100%.

L'effet stimulateur de ces HAP semble d'autant plus élevé que le potentiel carcinogène des molécules est élevé. Ainsi, le dibenz[a,h]anthracène, dont le potentiel carcinogène est supérieur à celui du benzo[a]anthracène, a un effet de stimulation supérieur sur des plants de tabac (Gräf, 1965).

Ces résultats suggèrent que les HAP de haut poids moléculaire comme le benzo[a]pyrène, de par leur mode d'action, pourraient être des stimulateurs de croissance comme les auxines, en constituer les précurseurs, ou bien perturber leur synthèse. Les HAP et certaines hormones végétales comme les gibbérellines présentent de plus une parenté structurale. Cette parenté se situe au niveau de la répartition des noyaux aromatiques.

2.2.2. Toxicité photo-induite des HAP sur les végétaux

Les HAP sont émis dans l'atmosphère à partir de multiples sources de combustion, l'utilisation de combustibles fossiles en particulier (Laflamme & Hites, 1978; Larsson & Sahlberg, 1981; Ockenden *et al.*, 1998; Bryselbout *et al.*, 1999, 2000; Kipopoulou *et al.*, 1999). Que ce soit dans la phase gazeuse ou la phase particulaire, ces HAP sont à l'origine de la contamination des végétaux par le dépôt sous forme sèche ou humide (Sabljic *et al.*, 1990; Keymeulen *et al.*, 1991). L'effet de splash (projection de particules de sol) dû aux précipitations peut de plus entraîner leur contamination par des particules de sol (Dreicer *et al.*, 1984).

Ces HAP, qui sont présents aux niveaux des organes aériens, réagissent avec les radiations solaires pour donner des photoproduits très réactifs et très souvent phytotoxiques (Greenberg *et al.*, 1993, 1997; Huang *et al.*, 1996; Ren *et al.*, 1996). Les orbitales π des noyaux aromatiques absorbent les radiations ultraviolettes de type A (320-400 nm) et B (290-320 nm). En présence d'oxygène, cette photoinduction des HAP produit des radicaux libres, dont l'oxygène libre. Ces espèces très réactives initient des réactions radicalaires en chaîne mettant en jeu les HAP et de nombreuses espèces chimiques présentes dans l'atmosphère, comme les oxydes d'azote. Ces réactions forment une multitude d'espèces chimiques réactives et toxiques, au nombre desquelles des dérivés oxydés, hydroxylés, nitrés et halogénés des HAP. Huang *et al.* (1993, 1996) et Ren *et al.* (1996) ont par exemple étudié la photoinduction de la toxicité de l'anthracène, du phénanthrène, du fluoranthène, du pyrène, du benzo[a]anthracène et du benzo[a]pyrène vaporisés sur les feuilles de colza (*Brassica napus*).

Les HAP vaporisés sur les feuilles et ayant subi une photoinduction provoquent des chloroses sur le point d'application. L'intensité de la chlorose est fonction de la quantité appliquée et de la fréquence d'application (Huang *et al.*, 1993, 1996; Ren *et al.*, 1996).

La photosynthèse est momentanément inhibée suite au contact des feuilles avec des HAP photomodifiés. Les analyses fluorimétriques conduites sur la chlorophylle montrent que, suite au contact des cellules où se produit la photosynthèse avec les photoproduits des HAP, des modifications apparaissent au niveau des photosystèmes, tant au niveau de leur nombre que du transport d'électrons entre les deux types de photosystèmes (I et II). Ces modifications entraînent une baisse de production des assimilats qui se répercute sur la croissance. L'effet des photoproduits est principalement visible au niveau des feuilles mais également au niveau des racines, sans que l'on sache si celui-ci est dû au transport de ces molécules. Ainsi, l'application de HAP sur les feuilles du colza se traduit par une diminution de la croissance, quel que soit son âge, et par une inhibition de l'élongation racinaire dans les premiers stades de la germination. Une diminution de l'élongation et de la division cellulaire est observée au niveau des cellules des feuilles, mais aussi des racines.

Les HAP ayant subi l'action des radiations solaires avant d'être vaporisés sur les feuilles ont les mêmes effets que les HAP n'ayant pas subi cette action. Cependant, à dose égale, les effets sont deux fois plus marqués avec les molécules non modifiées (Huang *et al.*, 1996). Les différents HAP ont de plus une action spécifique. Le benzo[a]pyrène a une très forte action inhibitrice sur la production de biomasse foliaire (jusqu'à 90 % d'inhibition par rapport au témoin) après photomodification mais n'est pas un bon photosensibilisateur, au contraire du fluoranthène. La photomodification de celui-ci est lente mais les dommages causés aux

membranes cellulaires sont importants. L'inhibition du nombre de racines et de leur longueur est par contre nulle, au contraire des autres HAP.

2.2.3. Phytotoxicité des HAP purs

Une seule étude met en évidence une réduction de la croissance d'espèces végétales en présence de composés purs (Wagner & Wagner-Hering, 1971). Ces auteurs ont montré que le benzo[a]pyrène et le benzo[b]fluoranthène n'avaient pas d'effet sur le riz, le blé de printemps et le maïs à des concentrations inférieures ou égales à $1,2 \text{ mg kg}^{-1}$ sol. A une concentration de benzo[b]fluoranthène de $6,25 \text{ mg kg}^{-1}$ sol, une inhibition de 11% de la masse des feuilles et des tiges produites est observée, mais les effets sur cette espèce ainsi que sur l'orge ne sont vraiment significatifs qu'à une concentration de benzo[b]fluoranthène supérieure à 18 mg kg^{-1} sol.

Les études de toxicité conduites par Huzelbos *et al.* (1993) sur la laitue ont par ailleurs montré que la concentration provoquant 50% d'inhibition de la production de biomasse (CL_{50}) était supérieure à $100 \mu\text{g g}^{-1}$ de sol pour le naphthalène et comprise entre 16 et $40 \mu\text{g g}^{-1}$ de sol pour l'acénaphthène. En solution hydroponique, la CL_{50} du naphthalène est comprise entre 4,8 et 34 mg l^{-1} et celle de l'acénaphthène entre 0,1 et $0,32 \text{ mg l}^{-1}$. On en déduit que l'intensité de la phytotoxicité des HAP dépend de leur disponibilité, qui est totale en solution mais réduite en présence de sol.

2.3. Conclusions

Au vu des données qui ont pu être rassemblées, les HAP semblent pouvoir dans certains cas exercer une action de type hormonale sur la croissance et le développement des végétaux supérieurs, et dans d'autres cas inhiber ces phénomènes. La photoinduction des HAP conduit dans tous les cas à la production de nombreuses molécules polaires très réactives, plus toxiques que les molécules mères. Les effets de phytotoxicité, constatés tant au niveau des feuilles que des racines, sont divers : chloroses, inhibition de l'élongation et de la croissance racinaire, inhibition de la photosynthèse et donc de la production d'assimilats, répercutée sur la croissance.

Ainsi, il existe peu de données sur la toxicité des HAP sur le développement des végétaux et celles-ci sont contradictoires. Il est donc apparu nécessaire d'étudier aussi bien la phytotoxicité des terres d'anciennes usines à gaz, que celle du matériau polluant le goudron, et celle des HAP, principaux polluants du goudron et cible de notre étude.

3. MATERIELS ET METHODES

Ce paragraphe présente l'ensemble des matériels et des méthodes expérimentales utilisées pour étudier 1) la germination, 2) la croissance et 3) le développement racinaire des végétaux en présence de différentes matrices contenant des HAP. Etant donnée la variété des matrices testées, les procédures expérimentales présentées sont nombreuses et ont été adaptées à chaque cas particulier.

3.1. Les terres

Les quatre terres utilisées au niveau des tests de phytotoxicité sont trois terres de site d'ancienne usine à gaz et une terre agricole. La caractérisation des propriétés physico-chimiques des 4 terres a été réalisée au laboratoire d'Analyse des Sols de l'INRA d'Arras. Ces propriétés sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Analyse granulométrique et caractéristiques physico-chimiques de la terre agricole et des trois terres d'anciennes usines à gaz utilisées au cours des tests de germination, de croissance ou de développement racinaire de différentes espèces végétales.

	Agricole	S	G1	G2
pH	5,9	8,4	8,2	10,4
Sables (%)	57,0	64,8	55,5	68,5
Limons (%)	31,9	26,5	23,6	20,7
Argiles (%)	11,1	8,7	20,9	10,8
Corg (%)	1,06	16,5	4,38	5,14
Norg total (%)	0,11	0,28	0,13	0,12
CaCO₃ (%)	n.d.	8,3	24,8	20,9
P₂O₅ (%)	0,043	0,009	0,009	0,019
CEC (CMol⁺kg)	5,3	7,6	10,8	8,3
16 HAP (mg kg⁻¹)	n.d.	108	1600	3500
Cap. au champ (%)	23,0	22,6	21,6	21,2

Corg : Carbone organique, déterminé selon la méthode Anne; Norg : Azote organique total déterminé selon la méthode Kjeldahl; P₂O₅ : Phosphore, déterminé selon la méthode Dyer pour la terre agricole et la méthode Joret-Hébert pour les terres d'ancienne usine à gaz; CEC : Capacité d'Echange Cationique, déterminée selon la méthode Metson; Cap. au champ : capacité au champ, déterminée selon la méthode de la presse à membrane, sur la terre fine uniquement dans le cas des terres d'ancienne usine à gaz.; n.d. : non détecté.

La terre agricole est un sable limoneux, correspondant à un sol brun acide, prélevé dans l'horizon Ap d'une parcelle cultivée située sur la commune de Chenevières (Meurthe-et-Moselle, 54). Dans la suite de ce mémoire, elle sera référencée "terre agricole".

La terre d'ancienne usine à gaz notée S a été prélevée dans l'horizon de surface (0-20 cm) d'une zone pour laquelle la teneur en 16 HAP EPA a été quantifiée, selon la méthode décrite dans le paragraphe 3.4. de ce chapitre, à 108 mg kg^{-1} . Les deux autres terres ont été prélevées à partir des stocks constitués lors du processus de réhabilitation du site noté G. Les deux terres sont notées G1 et G2 et présentent respectivement une teneur en 16 HAP EPA de 1600 et 3500 mg kg^{-1} . Ces terres d'ancienne usine à gaz présentent une texture sableuse et un pH basique. La terre G2 avait, de plus, fait l'objet d'un chaulage à 2% (w:w).

Pour l'ensemble des expérimentations, les échantillons de terre ont été séchés à l'air, homogénéisés et tamisés à 2 mm.

3.2. Les produits

3.2.1. HAP purs

Cinq HAP ont été testés : le naphthalène, le phénanthrène, le fluoranthène, le chrysène et le benzo[a]pyrène (pureté > 99%, Aldrich). Les principales propriétés physico-chimiques de ces molécules sont rappelées dans le tableau 1, présenté lors de l'introduction générale.

3.2.2. Le goudron

Un goudron a été prélevé sur le site G, dans une ancienne cuve de stockage. Il présente une consistance liquide-pâteuse. Une caractérisation de sa teneur en HAP a été conduite selon la méthodologie décrite dans le paragraphe 3.4. de ce chapitre. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.

La fraction volatile du goudron a été analysée qualitativement par CG-SM après injection directe selon la technique du Headspace, technique favorisant la désorption des molécules de faible poids moléculaire. Le matériel analytique est constitué d'un chromatographe en phase gazeuse (Varian Star 3400), d'un passeur automatique d'échantillons (Varian 8600) et d'un spectromètre de masse de type trappe ionique (Varian Saturn 2000). Les conditions d'analyse ont été les suivantes :

- Colonne

DB5-MS

Dimensions : 30 m x 0,25 mm diamètre interne

Épaisseur de phase : 0,25 μm

- Flux d'hélium : 11 psi

- Programmation en température du four

Gradient de 35°C à 200 °C à 4°C min⁻¹

Température de l'injecteur : 3°C au dessus de celle de la colonne

- Injection : "on column"

- Spectromètre de masse

Mode : impact électronique

Energie d'ionisation : 70 eV

Fenêtre de masse : 30-400 uma

Délai d'allumage : aucun.

Tableau 3 : Teneur en HAP du goudron d'ancienne usine à gaz utilisé (moyenne de 3 analyses \pm écart-type).

Produit	Teneur (mg g ⁻¹)
Naphtalène	36,1 \pm 8,9
Acénaphthylène	12,3 \pm 2,9
Acénaphène	1,6 \pm 0,4
Fluorène	13,0 \pm 2,8
Phénanthrène	29,3 \pm 6,6
Anthracène	10,6 \pm 2,3
Fluoranthène	18,0 \pm 3,7
Pyrène	12,2 \pm 2,6
Benzo[a]anthracène	8,1 \pm 1,7
Chrysène	6,1 \pm 1,1
Benzo[k]fluoranthène	6,1 \pm 1,1
Benzo[b]fluoranthène	5,4 \pm 1,0
Benzo[a]pyrène	6,3 \pm 1,2
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène	2,9 \pm 0,3
Benzo[g,h,i]pérylène	3,4 \pm 0,4
Dibenz[a,h]anthracène	1,0 \pm 0,3
Total 16 HAP EPA	172,4 \pm 37,3

3.3. Les espèces végétales

Deux lots d'espèces ont été utilisés. Le premier lot est constitué des espèces les plus fréquemment identifiées lors des prospections conduites sur plusieurs friches industrielles, l'ensemble des espèces étant répertorié en annexe, dont les semences étaient disponibles (en

quantités très limitées cependant) auprès du Conservatoire & Jardins Botaniques de Nancy. Ces espèces sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Espèces végétales "sauvages" utilisées au cours des tests de germination.

Espèce	Nom latin	Famille
Carotte sauvage	<i>Daucus carota</i> sbsp. <i>Carota</i>	Ombellifères
Chénopode blanc	<i>Chenopodium album</i>	Chénopodiacées
Coquelicot	<i>Papaver Rhoeas</i>	Papavéracées
Erigéron acer	<i>Erigeron acer</i>	Composées
Matricaire perforée	<i>Matricaria maritima</i> sbsp. <i>Inodora</i>	Composées
Millepertuis perforé	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypéricinées
Silène dioïque	<i>Silene dioica</i>	Caryophyllacées
Sysimbre officinal	<i>Sysimbrium officinal</i>	Brassicacées
Vipérine commune	<i>Echium vulgare</i>	Borraginacées

Le second lot est constitué d'espèces végétales représentatives de celles utilisées en grande culture, dont les semences sont disponibles sur le marché et dont la germination est certifiée. Ces espèces sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Espèces végétales cultivées utilisées pour les tests de germination, de croissance et de développement racinaire.

Espèce	Nom latin	Famille	Cultivar
Colza d'hiver	<i>Brassica napus</i>	Brassicacées	Goeland
Fétuque rouge	<i>Festuca rubra</i>	Graminées	Bastide
Lupin blanc doux	<i>Lupinus albus</i>	Papilionacées	Amiga
Luzerne	<i>Medicago sativa</i>	Papilionacées	Europe
Maïs	<i>Zea mays</i>	Graminées	DEA
Orge de printemps	<i>Hordeum vulgare</i>	Graminées	Scarlett
Ray-grass anglais	<i>Lolium perenne</i>	Graminées	Score
Trèfle violet	<i>Trifolium pratense</i>	Papilionacées	Marcon

Afin d'éliminer la variabilité due à la quantité de réserves présente dans les semences de lupin et de maïs, les graines utilisées ont été respectivement calibrées entre 250 et 300 mg pour le lupin et entre 240 et 280 mg pour le maïs (moyenne de 25 grains \pm 5%).

3.4. Méthodologie d'analyse des HAP dans un échantillon de sol

3.4.1. Conditionnement

Les échantillons de terre sont séchés à l'air libre puis tamisés à 2 mm. Pour chaque échantillon, une aliquote homogène de 30 g de terre, représentative de l'ensemble de l'échantillon, est constituée par réductions successives de la taille de l'échantillon, puis est broyée finement à l'aide d'un broyeur à billes en acier.

3.4.2. Extraction

L'extraction est conduite selon la méthode EPA 3550A, modifiée de manière à l'adapter aux échantillons analysés et à l'utilisation de l'acétone pure comme solvant d'extraction.

Des essais préliminaires ont permis de montrer que, malgré une teneur en HAP des sols relativement élevée, la procédure normalement appliquée pour les sols peu contaminés était plus adaptée. Le rendement d'extraction moyen sur 5 extractions est ainsi augmenté de plus de 83% lorsque la masse de terre extraite passe de 2 g à 30 g. Une telle différence montre que l'augmentation de la taille de l'échantillon permet une meilleure prise en compte de l'hétérogénéité du matériau, les écart-types d'extraction étant par ailleurs plus faibles dans le cas d'échantillons de 30 g de terre. De plus, la suppression du sulfate de sodium comme déshydratant améliore le rendement d'extraction des HAP de plus de 50% (moyenne de 5 échantillons) quelle que soit la procédure considérée. Etant donné que l'extraction des HAP est plus performante sur une terre légèrement humide (1-3% d'humidité), le sulfate de sodium est peut-être un déshydratant trop puissant. De plus, l'acétone est plus performante que le sulfate de sodium pour récupérer l'eau. Celle-ci se retrouve ainsi, de toute manière, dans l'extrait. En conséquence, la procédure normalement destinée aux échantillons peu contaminés, sans sulfate de sodium, a été utilisée. Le reste du protocole n'a pas été modifié.

Cette procédure conduit à extraire successivement 3 fois l'aliquote de terre pendant 30 min dans un bain à ultrasons (Branson), avec un rapport terre : solvant égal à 1 : 3. L'extrait est ensuite filtré, évaporé à sec dans un évaporateur rotatif sous vide, et repris dans 200 ml d'acétonitrile (HPLC grade), avant d'être analysé.

3.4.3. Conditions d'analyse par CLHP

L'analyse des extraits de sol est conduite par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) couplée à un détecteur UV. La chaîne de CLHP se compose d'une pompe (Varian 9012), d'un passeur automatique d'échantillons (Varian 9100), d'une colonne de type

Lichrospher 100RP-18 (250 x 4 mm, Merck) placée dans une enceinte thermostatée à 20°C, et d'un détecteur UV (Varian 9065 Polychrom), le tout piloté par le logiciel Varian Star Chromatography.

20µl d'extrait sont injectés. L'élution est effectuée avec un débit constant de 0,8 ml min⁻¹, selon un gradient eau ultrapure (UHQ, Elga) : acétonitrile (CLHP grade). Le rapport eau : acétonitrile est ainsi de 40:60 v:v à 0 min, 10:90 v:v à 12 min et 5:95 v:v à 15 min. La durée totale d'une analyse est de 35 min.

3.4.4. Conditions de détection en U.V.

La détection est effectuée au maximum d'absorbance pour chacun des 16 HAP, de manière à avoir la meilleure sensibilité de détection possible, soit à 210 nm (fluorène, fluoranthène et benzo[g,h,i]pérylène), 224 nm (naphtalène, acénaphène et acénaphthylène), 239 nm (pyrène et benzo[k]fluoranthène), 249 nm (phénanthrène, anthracène et indéno[1,2,3-c,d]pyrène), 259 nm (chrysène, benzo[b]fluoranthène et benzo[a]pyrène) et 287 nm (benzo[a]anthracène et dibenz[a,h]anthracène). La quantification est réalisée par comparaison à une gamme étalon, constituée de 4 solutions standards des 16 HAP dans l'acétonitrile aux concentrations 2,5, 5, 7,5 et 10 mg l⁻¹.

3.5. Méthodologie des tests culturaux

3.5.1. Conditions générales

3.5.1.1. Les test de germination

3.5.1.1.1. Conditions expérimentales

Ces tests sont réalisés selon la norme NF X31-201 (AFNOR, 1982), normalement conduite pour tester une substance et adaptée au test de substrats terreux. Les tests sont conduits en boîtes de Pétri en verre de 10 cm de diamètre. Trois boîtes contenant 25 graines sont mises en place pour chaque espèce et chaque traitement. Lorsque les espèces sauvages sont utilisées, le nombre de semences dans chacune des 3 boîtes est adapté à leur disponibilité, soit un nombre de semences par boîte compris entre 10 et 25. Les boîtes sont placées dans un incubateur thermostaté à 22°C, à l'obscurité. Les graines germées sont dénombrées chaque jour à heure fixe.

3.5.1.1.2. Test de germination en milieu liquide

Le support de germination est constitué d'un papier filtre imbibé de 5 ml de solution de la substance dont on veut tester la phytotoxicité. La solution témoin est constituée par de l'eau distillée.

3.5.1.1.3. Test de germination en milieu solide

Cinquante grammes de matériau terreux humidifié à 80% de la capacité au champ sont placés dans chaque boîte de Pétri. Le substrat témoin est la terre agricole de Chenevières, dans laquelle aucun HAP n'a été détecté.

3.5.1.1.4. Calculs

Le pourcentage d'inhibition de la germination d'une espèce en présence d'un substrat donné par rapport au témoin est calculé suivant l'équation [1] :

$$I_X = 100 \times (1 - N_X/N_T) \quad [1]$$

I_X : Pourcentage d'inhibition de la germination de l'espèce testée en présence du substrat X.

N_X : Nombre de graines germées sur le substrat X.

N_T : Nombre de graines germées sur le témoin.

3.5.1.2. Les tests de croissance

Ces tests sont réalisés selon la norme NF X31-202 (AFNOR, 1986) adaptée au test de substrats terreux. Les tests sont conduits dans des vases de végétation, remplis de terre humidifiée à 80% de sa capacité au champ.

Les divers tests ont été conduits en chambre de culture en conditions contrôlées : photopériode de 16h à 22°C, nyctipériode de 8h à 18°C, éclairage de 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$, humidité de l'air maintenue à 75% de la saturation et arrosage journalier afin de maintenir une humidité des terres constante.

3.5.2. Effet des terres d'AUG

3.5.2.1. Sur la germination

L'ensemble des espèces des deux lots a été testé sur les terres d'ancienne usine à gaz G1 et G2 juste après leur prélèvement, par rapport à un témoin constitué de terre agricole de Chenevières.

Les espèces dont la germination était fortement perturbée en présence de ces 2 terres - colza, fêtuque rouge, trèfle violet- ont ensuite été testées sur les mêmes terres après 2 ans de

traitement en bacs lysimétriques (voir chapitre 3) en présence de plantes, ainsi que sur la terre du site d'ancienne usine à gaz S.

3.5.2.2. Sur la croissance

Un test de croissance a été conduit en vases de végétation remplis d'1 kg des terres d'ancienne usine à gaz G1 ou G2, ou de terre agricole utilisée comme témoin. Du fait de la faible disponibilité de leurs semences, les espèces sauvages n'ont pu être testées. Seules les espèces du lot de grande culture ont été employées. Six répétitions ont été mises en place pour chaque espèce et chaque test. Le test s'est déroulé sur une période de deux mois, au cours de laquelle les hauteurs des plantules ont été mesurées chaque semaine. A la fin du test, les biomasses aériennes et racinaires ont été mesurées par pesée avant et après séchage (48h en étuve à 60°C).

3.5.3. Effet du goudron

3.5.3.1. Sur la germination

Deux espèces ont été choisies parmi le lot de grande culture : une espèce pour laquelle la germination n'est pas inhibée sur terre d'ancienne usine à gaz, l'orge, et une espèce dont la germination est moyennement inhibée, le colza.

3.5.3.1.1. Test de germination en boîte de Pétri fermées

Un test préliminaire a permis de fixer la gamme de concentration de goudron à réaliser avec la terre agricole et pour laquelle la germination des deux espèces était comprise entre 0 et 100%, soit 0-142 g de goudron kg⁻¹ de terre.

L'effet d'une dose croissante de goudron apportée dans la terre agricole de Chenevières a ensuite été testé, en boîte de Pétri fermées. Afin de reproduire la gamme de concentration précédemment déterminée, un échantillon de goudron a été mélangé à un échantillon de terre agricole de manière à produire un mélange homogène de concentration égale à 142 g goudron kg⁻¹ de terre. La terre contaminée à la concentration maximum de goudron a ensuite été mélangée ou non à de la terre agricole non contaminée en goudron afin de produire des échantillons présentant des concentrations en goudron de 0, 14, 33, 52, 71 et 142 g kg⁻¹ de terre.

3.5.3.1.2. Test de germination en boîtes de Pétri ouvertes

Dans un second temps, l'expérience précédente a été reconduite. Les boîtes de Pétri ont cette fois été laissées ouvertes sous une hotte ventilée. Un arrosage journalier des boîtes par pesée a été réalisé afin de compenser les pertes hydriques dues à l'aération.

3.5.3.1.3. Test de germination en présence de la fraction volatile du goudron

Le dispositif expérimental de boîtes de Pétri, utilisé pour le test de substances en solution ou dans un sol, a été adapté à l'étude de la toxicité de la fraction volatile des goudrons sur la germination du colza et de l'orge (figure 3).

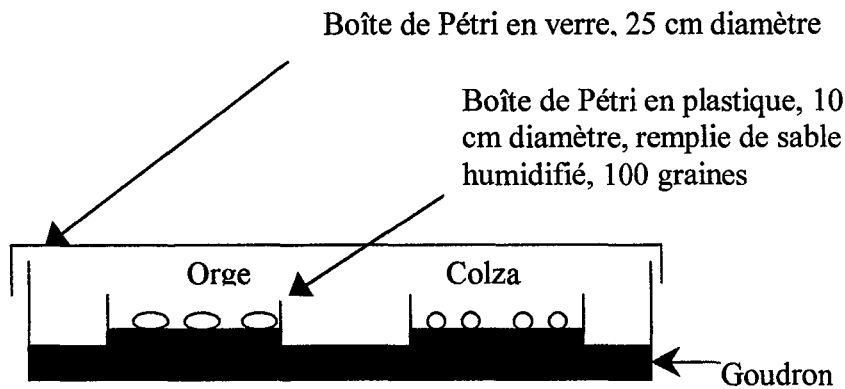


Figure 3 : Schéma du dispositif expérimental utilisé pour tester l'effet de la fraction volatile d'un goudron sur la germination de 2 espèces végétales.

3.5.3.2. Sur la croissance

La croissance de l'orge et du colza en présence de 3 concentrations de goudron (0, C1 et C2) a été étudiée. C1 (1% goudron) et C2 (0.2% goudron) ont été définies à partir des résultats obtenus avec le test de germination. Elles ne doivent pas avoir d'effet sur la germination mais éventuellement inhiber fortement (C1) ou faiblement (C2) la croissance des espèces.

Un échantillon de goudron a été mélangé à un échantillon de terre agricole de manière à produire une matrice homogène contaminée avec une concentration de 120 g de goudron kg^{-1} de terre. Cette matrice contaminée a ensuite été mélangée à de la terre agricole non contaminée afin de produire des échantillons de terre présentant des concentrations en goudron de 0, 2 et 10 g de goudron kg^{-1} de terre.

Une série de 27 vases de végétation remplis de 500 g de terre sont préparés, soit 9 vases pour chaque concentration en goudron. Dix graines ont été semées sur chaque pot. La culture a été conduite pendant 1 mois au cours duquel différentes mesures ont été effectuées. Le taux de

germination a été noté. Au bout de 2, 3 et 4 semaines, trois vases sont prélevés pour chaque traitement. Sur chacun des vases, les mesures suivantes sont réalisées : nombre de feuilles et hauteur des plantules, pesée des biomasses aériennes et racinaires fraîches et sèches (après passage 48h à l'étuve à 60°C).

3.5.4. Effet des produits purs

3.5.4.1. Sur la germination

La germination des espèces végétales du lot de grande culture a été testée en présence de solution aqueuse contenant l'un des 5 HAP suivants : naphthalène, phénanthrène, fluoranthène, chrysène et benzo[a]pyrène. Le support de germination est un papier filtre, afin de s'affranchir des phénomènes (adsorption, dégradation, formation de résidus liés), qui, dans un sol, limitent fortement la disponibilité des produits et donc leur effet potentiel. Pour chaque boîte de Pétri, 1 mg de composé est apporté dans 5 ml d'eau distillée afin de constituer une solution saturée. Le témoin est constitué d'eau distillée.

3.5.4.2. Sur la croissance

Le test de germination a permis de sélectionner une espèce dont la germination n'est pas inhibée en présence de HAP purs et dont la croissance est rapide. Un test de croissance du maïs en présence d'un HAP, le phénanthrène, a ainsi été réalisé.

3.5.4.2.1. Choix et calcul des concentrations de phénanthrène

Le test a été conduit en vases de végétation contenant 100 g de terre agricole de Chenevières contaminée ou non par des concentrations croissantes de phénanthrène. Les quatre concentrations de phénanthrène sont notées C1, C2, C3 et C4. Les concentrations C2, C3 et C4 sont calculées à partir de la concentration de base notée C1. Cette concentration tient compte des phénomènes d'adsorption des molécules hydrophobes par les matières organiques du sol. Ces phénomènes sont décrits par le coefficient de partition sol-solution de la molécule considérée, Kd. Ainsi, le Kd est fonction, d'une part du coefficient de partage eau-matières organiques (Kom) de la molécule, et, d'autre part, du pourcentage de matières organiques du sol (% MO), selon l'équation [2].

$$Kd = Kom \times (\% MO/100) \quad [2]$$

Le Kom peut être estimé à partir de la valeur d'hydrophobicité de la molécule, c'est à dire de son coefficient de partage octanol-eau, Kow, selon l'équation [3].

$$\log Kom = 0,52 \times \log Kow + 0,62 \quad [3]$$

Pour la terre agricole de Chenevières, dont le taux de MO est de 1,82%, et le phénanthrène, de Kow égal à 4,5, on obtient ainsi un coefficient Kd égal à 16,6. Ceci indique que pour une quantité de phénanthrène présente dans l'eau, une quantité 17 fois supérieure est présente sous forme adsorbée dans le sol.

La concentration C1 a été calculée afin de saturer théoriquement la solution du sol dans chaque vase de végétation. La quantité de phénanthrène nécessaire pour saturer les 30 ml d'eau apportés à chaque vase est de 36,3 µg. En tenant compte du Kd, C1 est donc égale à 7,26 mg kg⁻¹. Les quatre concentrations apportées sont donc 7,26, 14,52, 36,3 et 72,6 mg kg⁻¹.

3.5.4.2.2. Mise en place et conduite du dispositif

Quatre solutions de phénanthrène dans le dichlorométhane sont constituées. Une aliquote de solution est apportée à une aliquote de terre finement broyée pour chaque vase. Le solvant est évaporé sous hotte, à l'obscurité, et à pression et température ambiantes, puis l'aliquote de terre est mélangée avec le reste de la terre du vase de végétation. Le test cultural a duré un mois au cours duquel la hauteur des plantules a été régulièrement mesurée. A la fin du test, les biomasses aériennes et racinaires fraîches et sèches (après passage à l'étuve 48h à 60°C) ont été pesées.

3.6. Etude du développement racinaire d'une graminée en présence de terre d'AUG

3.6.1. Constitution des rhizotrons

Le dispositif est constitué de 24 rhizotrons. Un rhizotron est un vase de végétation en PVC de dimensions 30 x 25 x 8 cm, dont une face est constituée par une paroi transparente d'altuglas (figure 4).

Chaque rhizotron est d'abord rempli d'une couche de graviers de 5 cm, afin de constituer une zone drainante. Huit modalités de remplissage ont été testées, avec 3 réplicats pour chaque modalité. Les terres utilisées sont les terres d'ancienne usine à gaz G1 et G2 et la terre agricole de Chenevières, tamisées à 5 mm. La description des modalités est résumée dans le tableau 6 et est illustrée par la figure 5.

Les inclusions ont été réalisées à l'aide de tubes de PVC de 5,7 cm de diamètre. Pour cela, le rhizotron, sans sa face vitrée, est placé horizontalement. Des tubes sont disposés dans le rhizotron perpendiculairement au fond (figure 4). La terre destinée à l'inclusion est placée dans le tube. Le reste du rhizotron est rempli avec la terre adéquate. Puis, on retire le tube de PVC et on replace la surface transparente.

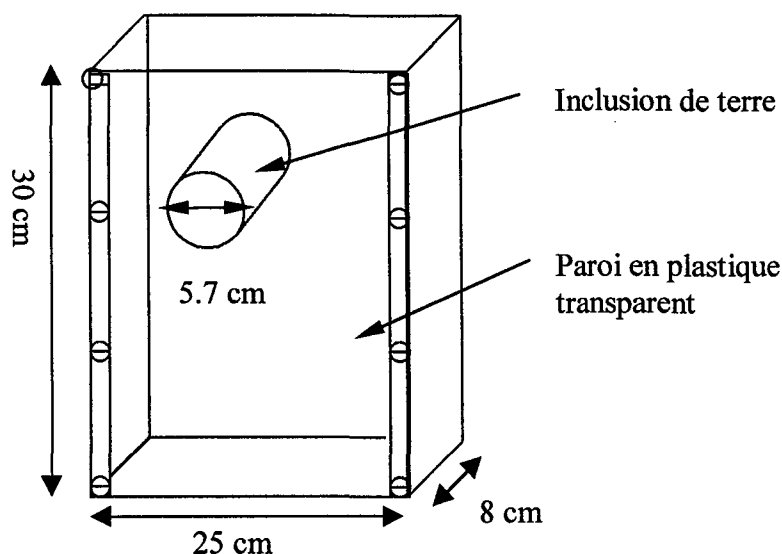


Figure 4 : Dispositif expérimental permettant de visualiser le développement racinaire des espèces végétales testées.

Tableau 6 : Description des différents traitements mis en place lors du remplissage des rhizotrons.

Numéro du traitement	Rhizotrons	Description
1	1-3	Inclusions de terre agricole dans la terre d'AUG G1
2	4-6	Inclusions de terre d'AUG G2 dans la terre agricole
3	7-9	Inclusions de terre d'AUG G1 dans la terre agricole
4	10-12	Zone de terre d'AUG G1 au milieu de la terre agricole
5	13-15	Zone de terre agricole au dessus de terre d'AUG G1
6	16-18	Zone de terre d'AUG G1 au dessus de terre agricole
7	19-21	Homogène terre G1
8	22-24	Homogène terre agricole

La densité des terres, calculée après confection à partir des volumes et masses de terres, est la même pour les 3 terres ($d = 0,9$ en moyenne). Après confection, les rhizotrons sont humidifiés par capillarité ascendante.

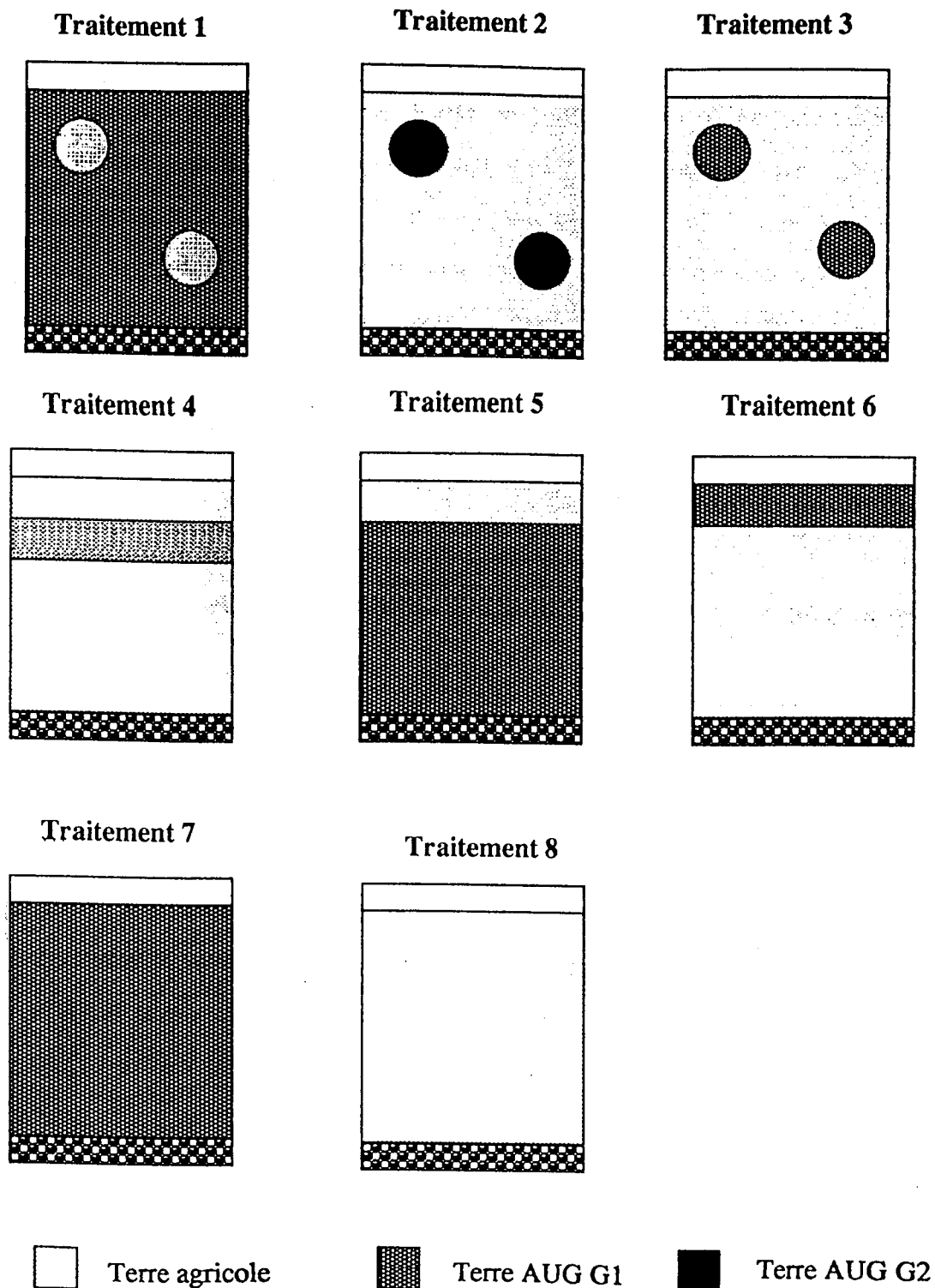


Figure 5 : Différentes modalités de remplissage des rhizotrons.

3.6.2. Conduite de l'essai en rhizotrons

0,4 g de semences de ray-grass ont été semés à la surface de chaque rhizotron. Le dispositif est ensuite placé en serre, face vitrée vers le bas sur un support incliné à 45 degrés, afin que les racines, qui présentent un géotropisme positif, se développent contre la vitre (photographie 2). La température de la serre est réglée à 20°C. Des lampes assurent une photopériode de 12

heures. Les rhizotrons sont arrosés chaque jour avec de l'eau du robinet. La durée du test est de 40 jours.



Photographie 2 : Disposition des rhizotrons sur leur support dans la serre.

3.6.3. Mesures

Les racines apparaissent sur la face transparente dès le 7^{ème} jour. La longueur des racines sur chaque rhizotron est enregistrée sur un transparent avec une fréquence de deux jours au départ puis de quatre jours. Dix enregistrements ont ainsi été réalisés. A chaque enregistrement, une photocopie 1:1 du transparent est réalisée.

Au bout de 40 jours, une coupe des parties aériennes a été réalisée. Les matières fraîches et sèches (après passage à l'étuve 48h à 60°C) ont été pesées.

En fin d'expérience, les racines des rhizotrons des traitements "terre homogène" (7 et 8) ont été intégralement récupérées et lavées, ainsi que celles présentes dans chacune des couches de terre des traitements 4, 5 et 6. Les matières racinaires fraîches et sèches (après passage en étuve pendant 48h à 60°C) ont été pesées.

4. RESULTATS ET DISCUSSION

Dans ce paragraphe, seront abordés successivement les résultats relatifs à la germination, la croissance de diverses espèces végétales et au développement racinaire d'une graminée en présence de différentes matrices contaminées par des HAP. Le développement des espèces a tout d'abord été étudié en présence des terres d'anciennes usines à gaz, puis du goudron, de la fraction volatile de ce goudron et enfin de HAP purs. Les terres d'anciennes usines à gaz ayant subi un pré-traitement en conditions naturelles ont aussi été testées, afin de mettre en évidence l'effet du vieillissement des terres sur leur toxicité.

4.1. Etude de la germination de différentes espèces végétales en présence de matrices contenant des HAP

4.1.1. Germination des végétaux en présence de terres d'anciennes usines à gaz brutes d'excavation

Des tests de germination ont été conduits pour l'ensemble des espèces végétales, cultivées et sauvages, en présence de terres d'anciennes usines à gaz brutes d'excavation, représentatives de l'état des terres qui pourraient faire l'objet du phytotraitement. La terre agricole ne contenant pas de HAP a été utilisée comme référence pour ces tests.

Les résultats de germination des espèces sauvages ne sont pas, à l'exception du chénopode et de la vipérine, différents de ceux des espèces cultivées. De plus, les quantités de graines disponibles de ces espèces disponibles n'étaient pas suffisantes pour envisager leur utilisation dans l'ensemble des tests conduits ultérieurement. Par conséquent, dans l'exposé des résultats, nous présenterons principalement les espèces cultivées.

Les espèces testées présentent deux types de comportement. Ils seront présentés successivement. La germination d'une partie des espèces est indifférente à la présence de contamination, tandis que d'autres espèces y sont sensibles : soit leur taux de germination augmente, soit il diminue en présence de terres d'anciennes usines à gaz.

4.1.1. Germination indifférente à la présence de contamination

Le comportement indifférent est illustré par la figure 6 qui présente la germination de l'orge de printemps en présence des terres d'ancienne usine à gaz G1 et G2 et de la terre agricole utilisée comme témoin. Les courbes de germination de l'orge sont identiques sur les trois terres quel que soit le temps considéré. Le taux de germination atteint 100% sur les 3 terres après 3 jours de germination.

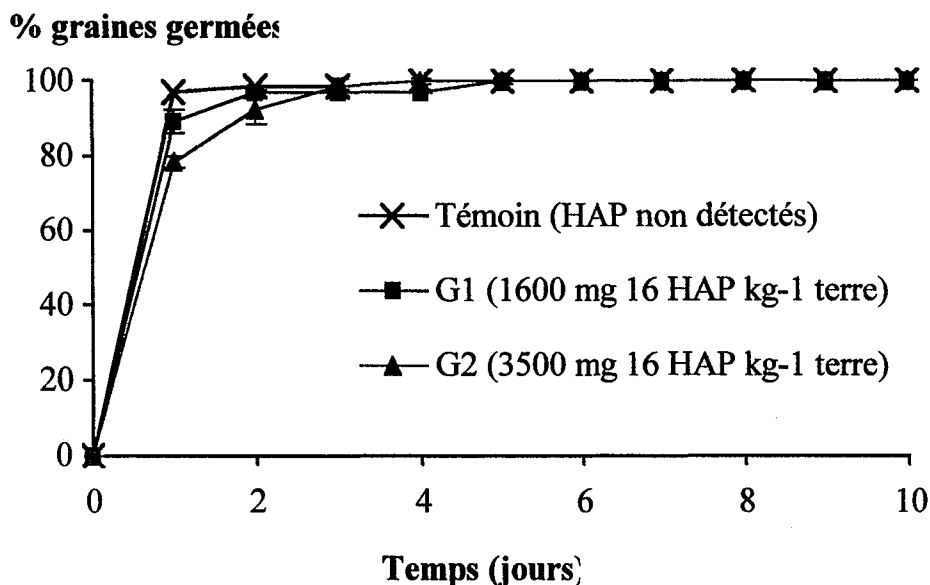


Figure 6 : Germination de l'orge de printemps sur les terres d'ancienne usine à gaz G1 et G2 ainsi que sur la terre agricole témoin.

Après 24 h, le taux de germination de l'orge sur les 2 terres d'ancienne usine à gaz est cependant significativement inférieur à celui observé sur la terre témoin. Cette différence n'est plus significative au delà de 24 h.

L'orge se comporte donc de manière indifférente pour sa germination vis à vis de la présence de contamination. Ce comportement est aussi observé pour le maïs et pour le ray-grass, deux autres espèces de la famille des graminées. Ces résultats semblent ainsi traduire l'existence d'une tolérance de ces espèces à la présence de contamination dans le sol. Les mécanismes de cette tolérance ne sont cependant pas connus.

Toutefois, l'hypothèse de la tolérance est d'autant plus probable que la majorité des espèces testées est sensible à la présence de contamination.

4.1.1.2. Germination sensible à la présence de contamination

La sensibilité de la germination à la présence de terres d'ancienne usine à gaz est illustrée par la figure 7 qui présente les résultats obtenus pour le trèfle violet. En présence de terres d'ancienne usine à gaz, une latence de la germination du trèfle est observée. Ainsi, au bout de 2 jours, si le taux de germination du témoin atteint 80%, celui sur G1 atteint seulement 40% et celui sur G2 10%. Après 2 jours, une autre partie des graines germe, mais, à 10 jours, le taux de germination du trèfle sur G1 (soit 80%) et sur G2 (soit 60%) reste cependant significativement inférieur à celui du témoin (soit 97%).

% graines germées

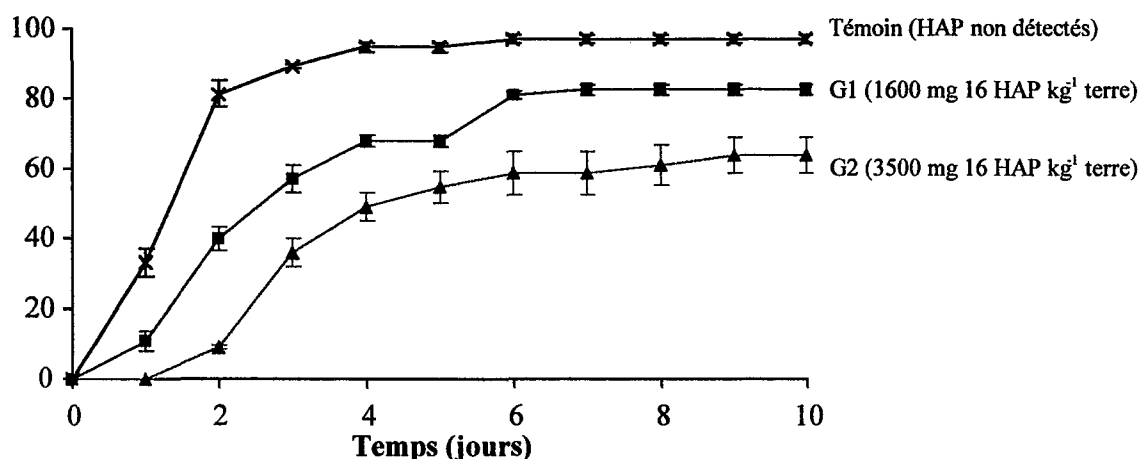


Figure 7 : Germination du trèfle violet sur les terres d'ancienne usine à gaz et G2 ainsi que sur la terre agricole témoin.

Il existe donc une phytotoxicité des terres d'ancienne usine à gaz sur la germination du trèfle violet qui se traduit par une inhibition de sa germination. Ces résultats sont également vérifiés pour certaines plantes sauvages - le millepertuis, le coquelicot, la matricaire et l'érigéron – et certaines plantes cultivées – le colza, la fêtuque, le lupin et la luzerne.

Cette phytotoxicité peut être due à de nombreux composés présents dans la terre d'ancienne usine à gaz, dont certains ont des effets connus sur les végétaux (Ivens, 1952; Reynolds, 1977, 1978, 1987; Chaîneau, 1995). Les phénols, les acides organiques et les métaux lourds inhibent la germination de nombreuses espèces. Les cyanures ont une action inhibitrice sur la respiration. Enfin, les naphthas ont une action phytotoxique reconnue sur la germination. Cependant, à ce stade de nos travaux, nous ne pouvons pas conclure quant à la raison de cette phytotoxicité des terres d'anciennes usines à gaz.

Par ailleurs, pour deux espèces sauvages, le chénopode et la vipérine, le taux de germination obtenu après 10 jours de contact avec les terres G1 et G2 sont très significativement supérieurs à ceux obtenus avec la terre agricole. Pour le chénopode, ces taux de germination sont en effet de 5% environ sur la terre témoin et compris entre 40 et 60% sur les terres d'anciennes usines à gaz. Toutefois, les lots de semences des espèces sauvages présentent une très grande variabilité de leur capacité germinative y compris sur une matrice non toxique. Il est donc difficile de conclure sur la signification de ces résultats particuliers. Cependant, on ne peut pas exclure pour ces deux espèces, dont les graines présentent des téguments

relativement épais, une action des produits présents dans les terres sur ces enveloppes ayant entraîné une stimulation de la germination et/ou une levée de la dormance.

Trois types de comportements des espèces végétales vis à vis de leur germination en présence de terres d'ancienne usine à gaz sont donc mis en évidence. Si toutes les espèces tolèrent la présence de HAP, leur sensibilité varie fortement.

4.1.1.3. Sensibilité des espèces aux terres d'anciennes usines à gaz

La sensibilité des espèces peut être estimée à partir de l'inhibition de germination constatée en présence de terres d'anciennes usines à gaz par rapport à la terre témoin. Cette inhibition est calculée grâce à l'équation [1] décrite dans le paragraphe 3.5.1.1. de ce chapitre. Le tableau 7 présente les taux d'inhibition de la germination des espèces cultivées observés pour les terres G1 et G2.

Tableau 7 : Inhibition de la germination des espèces végétales cultivées en présence de terres d'anciennes usines à gaz G1 et G2 par rapport à la terre agricole témoin sans HAP.

Espèce	% inhibition G1	% inhibition G2
Colza	0,0	12,2
Fétuque	10,7	71,4
Lupin	8,2	11,0
Luzerne	7,0	8,3
Maïs	0,0	0,0
Orge	0,0	0,0
Ray-grass	0,0	0,0
Trèfle violet	15,1	38,2

% d'inhibition I : calculé selon l'équation $I(X) = 100 \times (1 - N(X)/N(T))$ avec N(X) le nombre de graines germées sur le substrat X et N(T) le nombre de graines germées sur le témoin.

De tels résultats sont semblables à ceux obtenus pour la contamination par des terres par les hydrocarbures (Udo & Fayemi, 1975; Amakiri & Onofeghara, 1984; Terje, 1984; Chaîneau *et al.*, 1997).

Parmi les espèces végétales citées dans le tableau 7, celles appartenant à la famille des graminées, le maïs, l'orge et le ray-grass en particulier, sont les plus indifférentes, tandis que les légumineuses comme le trèfle présentent un taux d'inhibition de germination compris entre 15 et 40%. Ce type de comportement différentiel est également mis en évidence en présence de fuel par Terje (1984).

4.1.1.4. Conclusion

Les espèces végétales sauvages et cultivées tolèrent les contaminants variés présents dans les terres d'anciennes usines à gaz. Cette tolérance est soit totale pour certaines espèces comme le ray-grass, soit partielle pour la majorité des autres espèces. Dans le cas où une inhibition partielle de la germination est observée, on ne peut conclure quant au(x) produit(s) responsables de cette toxicité, car ceux-ci sont nombreux. Toutefois, les espèces graminées sont globalement plus tolérantes que les autres espèces. Les terres d'AUG exercent par contre un fort effet toxique sur les espèces légumineuses.

Dans un second temps, afin de mieux cerner l'origine de la toxicité, la germination des différentes espèces cultivées en présence de goudron, principale matière polluante présente dans les terres d'anciennes usines à gaz, a été étudiée.

4.1.2. Germination en présence de goudron

Dans cette partie les modalités de la germination de l'orge et du colza en présence de terre agricole contaminée ou non par des concentrations croissantes de goudron, en boîtes de Pétri fermées, ont été étudiées. Les résultats présentés feront référence 1) aux cinétiques de germination, 2) aux courbes dose de goudron-réponse de la plante et 3) à l'état des tissus des semences après contact avec le goudron.

4.1.2.1. Cinétique de germination de l'orge et du colza en présence de goudron

La figure 8 illustre les résultats de germination obtenus pour l'orge en présence de concentrations croissantes de goudron dans la terre agricole.

Une latence de la germination de l'orge est enregistrée dès l'apport de 14 g goudron kg⁻¹ terre. Cependant, pour cette concentration, cette latence n'est pas suivie d'un effet permanent et le taux de germination après 6 jours de test est égal à celui du témoin. Au delà de cette concentration, le phénomène de latence de la germination est d'autant plus marqué que la concentration en goudron augmente. Pour ces concentrations, un effet permanent est mis en évidence. Ainsi, après 8 jours de test, le taux de germination de l'orge en présence de concentrations de goudron supérieures à 14 g kg⁻¹ terre est significativement inférieur à celui du témoin. Sur la terre agricole en effet, 100% des graines d'orge ont germé, tandis qu'en

présence de 52 et 142 g goudron kg^{-1} , seulement 45% et respectivement 1% des semences ont germé.

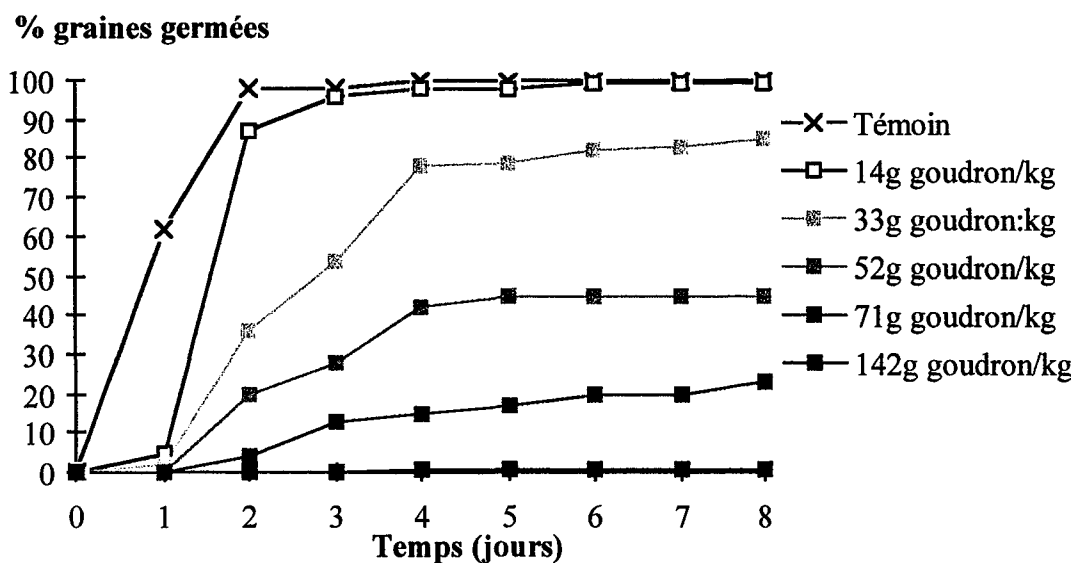


Figure 8 : Germination de l'orge en présence de terre agricole témoin et de terre agricole mélangée à des concentrations croissantes de goudron d'anciennes usines à gaz. Les écart-types sont inférieurs à la taille des symboles.

Ces résultats mettent donc en évidence une inhibition de la germination de l'orge en présence de goudron. Ce résultat est aussi observé pour le colza. Le comportement de cette espèce en présence de goudron est, aux valeurs près, le même que celui observé sur les terres d'anciennes usines à gaz, ce qui semble suggérer que la phytotoxicité de ces terres est due en grande partie à la présence des goudrons. Par contre, l'orge ne montrait aucune inhibition significative en présence de terres d'ancienne usine à gaz. L'inhibition de germination est supérieure en présence de terre contaminée par les goudrons, probablement parce que le niveau de contamination est plus élevé que dans la terre d'ancienne usine à gaz.

Après avoir caractérisé l'évolution de la germination au cours du temps, dans une deuxième phase, les courbes de réponse de la plante à des concentrations croissantes de goudron ont été analysées.

4.1.2.2. Courbes dose-réponse de la germination de l'orge et du colza en présence de goudron

La réponse de l'orge et du colza aux concentrations croissantes de goudron, évaluée par le pourcentage de graines germées à 8 jours, est illustrée par la figure 9. Le taux de germination de l'orge diminue fortement aux concentrations supérieures à 14 g goudron kg^{-1} terre, de façon

proportionnelle à la teneur en goudron. Le taux de germination du colza diminue peu entre 0 et 33 g goudron kg⁻¹ terre. Au delà de cette concentration, on observe une diminution forte du taux de germination, proportionnelle à la teneur en goudron.

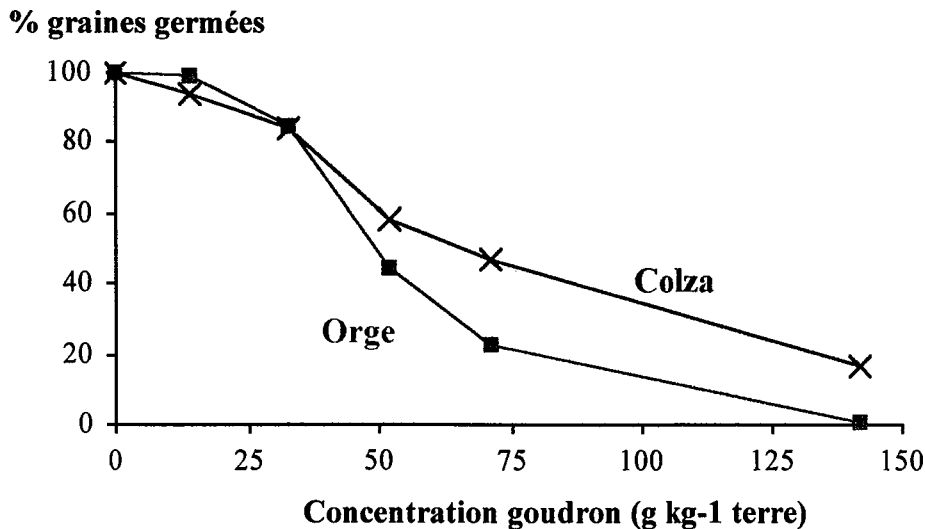


Figure 9 : Courbes dose-réponse de la germination du colza et de l'orge après 8 jours de contact avec des concentrations croissantes de goudron dans la terre agricole.

Ces courbes montrent une légère différence de sensibilité des 2 espèces. La concentration provoquant 50% d'inhibition de la germination (CL₅₀) est ainsi de 50 g de goudron par kg de terre pour l'orge et de 66 g goudron par kg de terre pour le colza.

Les travaux de Chaîneau (1995) ont montré que la CL₅₀ de l'orge en présence de fuel était de 0,4 g kg⁻¹. La sensibilité de cette espèce est donc plus forte en présence de fuel que de goudron. Ces 2 matrices sont composées d'un mélange complexe de composés hydrocarbonés mais n'ont pas la même composition. Le goudron contient majoritairement des composés aromatiques de fort poids moléculaire, tandis que le fuel n'en contient que 30% mais présente une forte teneur en composés légers et volatils. Ce résultat différentiel tendrait donc à montrer que plus la matrice est polyaromatique, moins elle est phytotoxique. Cette hypothèse sera discutée dans la suite du travail.

Les valeurs de CL₅₀ obtenues pour l'orge et le colza sont proches mais le comportement de ces espèces en présence de goudron est différent, de même que la cinétique d'apparition des symptômes de toxicité.

4.1.2.3. Symptômes de phytotoxicité des goudrons sur l'orge et le colza

Les différences de comportement de l'orge et du colza mises en évidence en présence de goudron se traduisent par des différences dans l'intensité des phénomènes de phytotoxicité observés. La latence de la germination observée pour ces espèces n'est au départ pas corrélée à l'apparition de symptômes sur les semences. La destruction des semences n'est donc vraisemblablement que partielle. Un début d'élongation racinaire est observé pour l'orge aux faibles concentrations de goudron, tandis que les semences de colza sont détruites rapidement après germination.

Après 2 jours, tant pour l'orge que le colza, les téguments des semences qui ne germent pas présentent un aspect normal mais les tissus internes (réserves, embryon) prennent un aspect laiteux et une consistance liquide. Ces symptômes traduisent la destruction complète de la semence et de sa capacité germinative. De tels symptômes sont par ailleurs observés sur de nombreuses espèces végétales en présence de différents produits pétroliers par Udo & Fayemi (1975), Reynolds (1977), Amakiri & Onofeghara (1984), Oudot (1994) ou Chaîneau (1995). Ces résultats confirment ceux relatés dans le paragraphe précédent quant à la phytotoxicité du goudron, mais ne permettent pas de qualifier plus précisément la nature des produits phytotoxiques. Les résultats discutés dans le paragraphe 4.1.2.2., ainsi que l'étude des données bibliographiques suggèrent cependant que les molécules volatiles sont beaucoup plus phytotoxiques que les fractions aromatiques de haut poids moléculaire. L'effet de la fraction volatile du goudron sur la germination des espèces a donc été examinée.

4.1.3. Etude de la phytotoxicité de la fraction volatile du goudron sur la germination de l'orge et du colza

4.1.3.1. Etude de la phytotoxicité

Le dispositif utilisé pour les tests de germination a été adapté au test de composés volatils (chapitre 1, paragraphe 3.5.3.1.3., figure 3). Après 8 jours de test, les taux de germination de l'orge et du colza en présence de la fraction volatile du goudron sont identiques à ceux obtenus lorsque ces espèces étaient testées en présence de terre agricole contaminée par 142 g goudron kg⁻¹ terre, soit 1% de germination pour l'orge et 20% pour le colza.

Ces résultats confirment donc ceux discutés dans les paragraphes précédents. Afin de les valider, l'évolution de la phytotoxicité de la terre agricole contaminée par des concentrations croissantes de goudron a ensuite été étudiée en laissant les boîtes de Pétri ouvertes et placées sous une hotte ventilée, afin de diluer la fraction volatile.

4.1.3.2. Effet de la ventilation sur la phytotoxicité du goudron

Le test de germination décrit dans le paragraphe 4.1.2. de ce chapitre a permis d'obtenir les courbes de toxicité du goudron sur la germination de l'orge et du colza en fonction de sa concentration dans la terre. Ces résultats, illustrés sur la figure 10, ont été obtenus en conditions de non dilution (boîtes fermées) ou de dilution (boîtes ouvertes) de la fraction volatile.

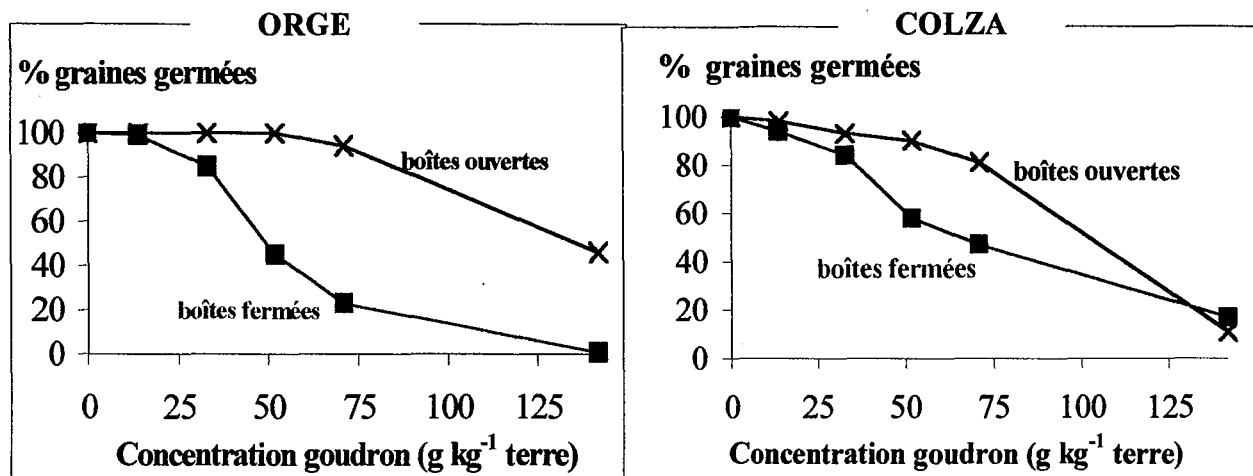


Figure 10 : Courbes dose-réponse de la germination de l'orge et du colza après 8 jours de contact avec la terre agricole contaminée par des concentrations croissantes de goudron, en conditions permettant la dilution ou non des composés volatils dans l'atmosphère.

La proportion de graines d'orge et de colza germées diminue fortement au delà d'une concentration de 71 g goudron kg⁻¹ de terre agricole. Un effet très significatif de la ventilation sur le taux de germination de l'orge est observé. En effet, le taux de germination du colza en présence de la plus haute concentration en goudron augmente d'environ 20% et celui de l'orge de 50% lorsque les boîtes de Pétri sont ouvertes.

Pour l'orge, la CL₅₀ de goudron passe de 50 g kg⁻¹ terre en absence de dilution de la fraction volatile du goudron à 108 g goudron kg⁻¹ terre lorsque cette fraction est diluée. Pour le colza, ces valeurs sont respectivement de 66 g goudron kg⁻¹ terre en atmosphère non diluée et 102 g goudron kg⁻¹ terre en atmosphère diluée. Ces résultats montrent que, la fraction volatile est effectivement phytotoxique puisque sa dilution se traduit par une diminution de la phytotoxicité.

Ce résultat est très important puisque il indique qu'en milieu aéré, la germination des espèces est assurée pour des concentrations de goudron dans la terre qui sont largement supérieures à celles généralement observées pour les terres d'anciennes usines à gaz devant être traitées par

une méthode biologique. En effet, si on prend l'exemple de la terre G2, en considérant la teneur en HAP du goudron correspondant, on peut évaluer la teneur en goudron de la terre à environ 20,3 g kg⁻¹ terre.

Pour affiner ces résultats, et afin de les comparer aux données de la bibliographie, nous avons ensuite essayé de qualifier les molécules majoritairement présentes au niveau de la fraction volatile du goudron.

4.1.3.3. Identification de composés présents dans la fraction volatile du goudron

L'analyse de la fraction volatile du goudron a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, selon la technique du headspace. Les composés ont été identifiés grâce à leurs fragments caractéristiques et à la co-injection de standards. La figure 11 présente les analyses ayant conduit à l'identification du benzène, du toluène, des isomères du xylène, du naphthalène et de ces dérivés alkylés dans la fraction volatile du goudron.

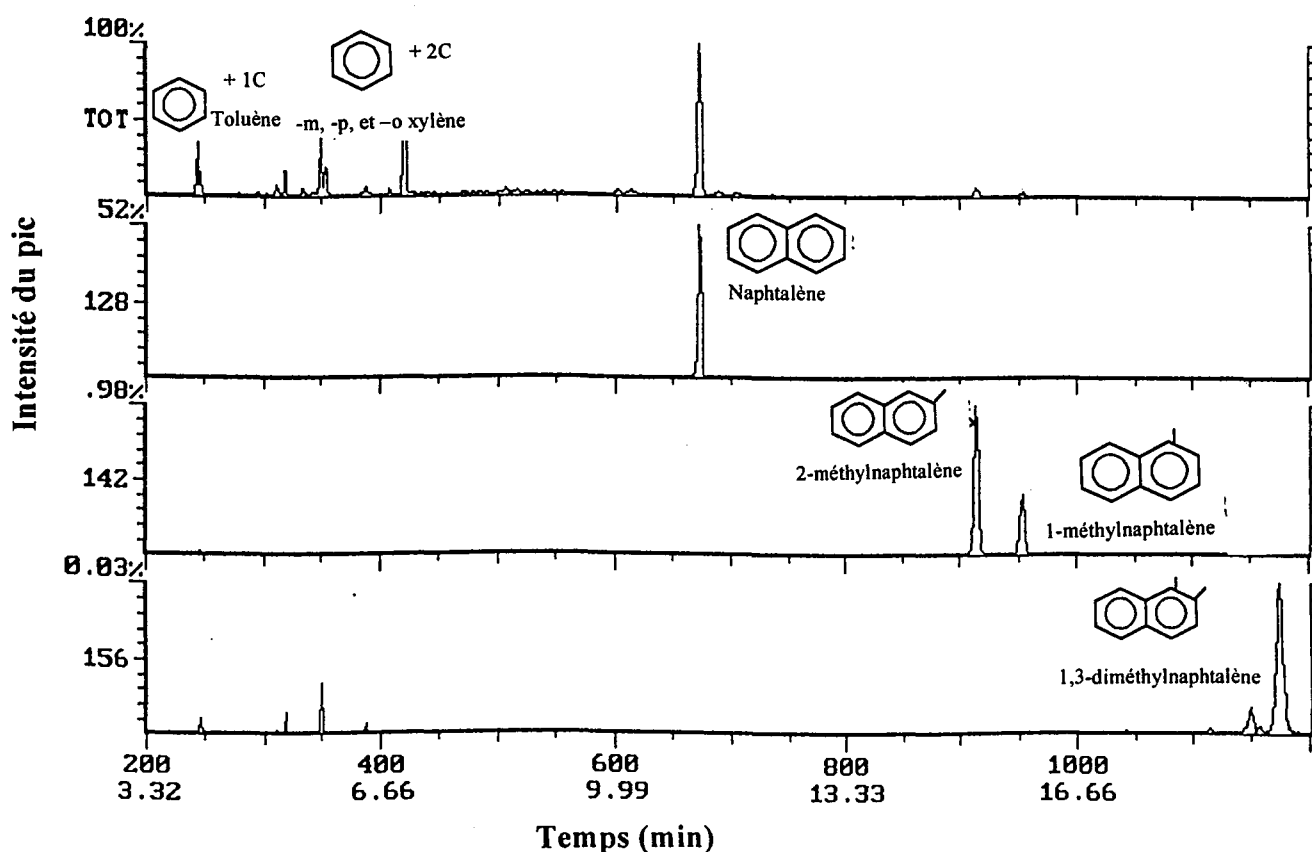


Figure 11 : Chromatogramme du courant ionique total et du courant ionique caractéristique du naphthalène (m/z=128), des méthyl-naphtalènes (m/z=142) et des diméthyl-naphtalènes (m/z=156).

Les composés identifiés sont particulièrement abondants dans la fraction volatile, ce qui suggère qu'ils sont responsables de la phytotoxicité du goudron. Cette hypothèse est de plus corroborée par les travaux conduits par Havis (1949), Huzelbos *et al.* (1993) ou Oudot (1994), qui ont examiné la phytotoxicité de ces composés pris à l'état pur. L'ensemble de ces molécules volatiles sont référencées sous le nom générique de naphtas.

4.1.3.4. Conclusions

La fraction volatile du goudron, constituée de molécules au nombre desquelles le naphtalène et ses isomères alkylés, est responsable de la phytotoxicité du goudron sur la germination de deux espèces et vraisemblablement, en partie, de la phytotoxicité des terres d'anciennes usines à gaz. La présence de naphtalène dans la fraction phytotoxique conduit cependant à s'interroger sur sa réelle phytotoxicité, ainsi que sur celle des HAP de plus haut poids moléculaire. Afin de répondre à cette question, des tests de germination en présence de divers HAP purs ont été réalisés.

4.1.4. Germination de différentes espèces végétales en présence de HAP purs

4.1.4.1. Cinétique de germination des végétaux en présence de HAP purs

Des tests de germination ont été conduits avec les espèces végétales cultivées en présence de solutions saturées par l'un des cinq HAP suivants : le naphtalène, le phénanthrène, le fluoranthène, le chrysène et le benzo[a]pyrène. La figure 12 illustre les résultats obtenus pour le colza en présence d'eau distillée (témoin) et de solution de naphtalène ou de benzo[a]pyrène.

En présence des molécules de moins de cinq cycles, on observe une latence de germination pendant les premiers jours du test. Cette latence ne se traduit pas par une inhibition du taux de germination au bout de 14 jours. La latence à la germination est particulièrement marquée pour le naphtalène, tandis que, pour les HAP de plus haut poids moléculaire, la germination est plus rapide que celle du témoin. Cependant, dans tous les cas, après 5 jours, le taux de germination n'est plus différent de celui du témoin.

Les résultats des courbes de germination en fonction du temps suggèrent ainsi que 1) le naphtalène est phytotoxique, ce qui est en accord avec les résultats discutés antérieurement dans ce chapitre, et 2) les HAP de plus haut poids moléculaire stimulent la germination des espèces dans les conditions retenues et pour des concentrations faibles. Cet effet est corroboré par les travaux de Gräf & Nowak (1966), qui comparent l'action stimulatrice du

benzo[a]pyrène, à très faibles doses, sur le développement d'algues et de végétaux supérieurs, à une action de type hormone végétale.

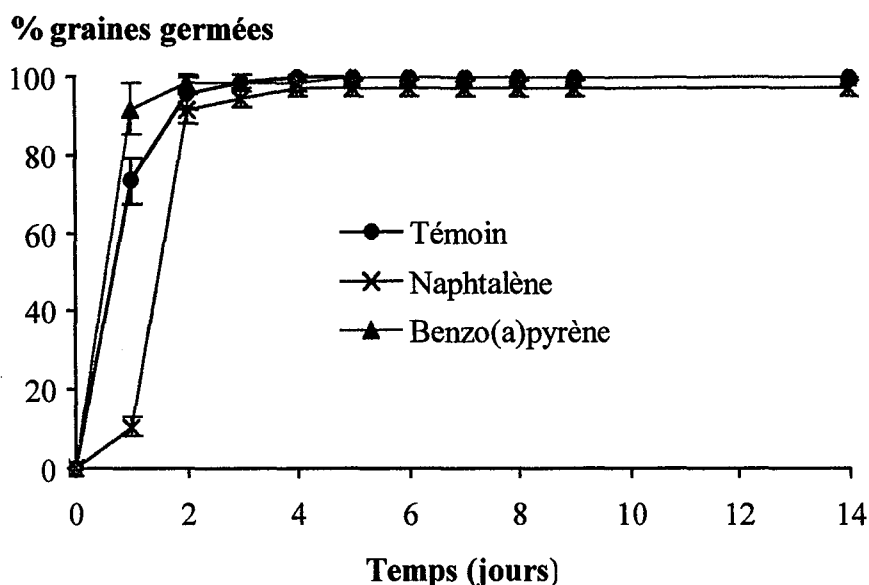


Figure 12 : Germination du colza en présence d'eau distillée (témoin) ou de solution aqueuse saturée en naphthalène et benzo[a]pyrène. Nb : les courbes relatives au phénanthrène et au fluoranthène sont comprises entre celle du témoin et celle du naphthalène, la courbe relative au chrysène est pratiquement confondue avec celle du benzo[a]pyrène.

Ainsi, un effet transitoire des HAP sur la germination du colza est observé. Ce résultat est généralisable à l'ensemble des espèces cultivées testées.

Les taux de germination des diverses espèces dans les premiers jours de contact avec la solution témoin et les solutions saturées de HAP ont ensuite été comparés, en relation avec les propriétés physico-chimiques des molécules.

4.1.4.2. Effet des HAP purs sur la germination des espèces cultivées

Un effet significatif des HAP sur la germination des espèces est mis en évidence pendant 2 jours pour l'ensemble des espèces testées (Tableau 8). Globalement, le taux de germination augmente significativement dans l'ordre suivant : naphthalène < fluoranthène < phénanthrène < témoin < chrysène < benzo[a]pyrène.

Ces résultats suggèrent que les HAP de haut poids moléculaire stimulent la germination des espèces. Le naphthalène a un effet inhibiteur pour toutes les espèces sauf le lupin. Le fluoranthène a un effet phytotoxique sur la germination du colza, et de l'orge mais stimule apparemment celle des autres espèces. Cet effet est transitoire. Cependant, comme les boîtes

de Pétri ne sont pas fermées de façon étanche, les HAP les plus légers ont pu se volatiliser, ce qui expliquerait qu'après 3 jours, l'effet des HAP n'est plus significatif. Au tout début du test au contraire, étant donné la quantité de produit apportée, l'ensemble du dispositif (eau+air) est saturé en HAP, ce qui a probablement permis d'observer un effet.

Tableau 8 : Pourcentages de graines germées après 1 jour de contact avec la solution témoin sans HAP ou les solutions aqueuses saturées en naphtalène, phénanthrène, fluoranthène, chrysène ou benzo[a]pyrène.

	Colza	Féтуque	Lupin	Maïs	Orge	Trèfle
Témoin	40,0 b	0,0 c	14,7 d	38,7 c	73,3 b	38,7 c
Naphtalène	0,0 d	0,0 c	42,7 c	33,3 c	10,7 d	8,0 d
Phénanthrène	29,3 c	0,0 c	62,7 a	77,3 b	78,7 b	73,3 a
Fluoranthène	22,7 c	62,1 a	61,3 a	76,0 b	56,0 c	56,0 b
Chrysène	50,7 ab	17,3 b	54,7 b	74,7 b	92,0 a	80,0 a
Benzo[a]pyrène	62,7 a	14,7 b	53,3 b	89,3 a	96,0 a	84,0 a

Les valeurs d'une même colonne affectée de lettres différentes sont significativement différentes, n=3 et p=0,05.

L'effet des molécules légères et celui des molécules de plus haut poids moléculaire sont différents. Afin de vérifier si cette différence était liée au hasard, nous avons donc examiné la répartition des taux de germination observés en relation avec l'ensemble des propriétés physico-chimiques des HAP. Le taux de germination obtenu pendant les premiers jours de test est ainsi assez bien corrélé à la solubilité ($r^2=0,916$), à la pression de vapeur ($r^2=0,954$) et au log Kow ($r^2=0,744$) des molécules. Les meilleures corrélations sont ainsi observées pour les propriétés physico-chimiques des molécules déterminant la répartition dans le système sol-eau-atmosphère.

Ces corrélations montrent donc que les taux de germination obtenus sont corrélés aux propriétés physico-chimiques des molécules, celles gouvernant leur répartition entre la phase aqueuse et la phase gazeuse en particulier. Etant donné que le système n'était pas étanche, l'importance de ces propriétés pourraient cependant traduire la redistribution perpétuelle du produit entre la solution et la phase gazeuse qui s'appauvrit. Cet appauvrissement se traduisant au final par une absence d'inhibition de la germination.

4.1.4.3. Conclusions

Concernant les terres d'anciennes usines à gaz, l'ensemble des résultats obtenus indique que leur phytotoxicité sur la germination des espèces végétales testées est due en grande partie au goudron. La phytotoxicité de ce goudron est en partie expliquée par celle de sa fraction

volatile. Parmi les composés présents dans cette fraction, on trouve le naphthalène, dont la phytotoxicité sur la germination de diverses espèces a pu être vérifiée à l'état isolé. Dans le même ordre d'idée, l'absence de phytotoxicité des composés de plus haut poids moléculaire a pu être vérifiée. Dans un contexte plus appliqué, la phytotoxicité des terres d'AUG pose un problème en terme d'installation d'un couvert végétal.

Ces résultats semblent cependant être en désaccord avec l'abondance de la flore qui peut être identifiée sur certains sites d'anciennes usines à gaz, y compris dans des zones très contaminées en HAP (goudrons). Toutefois, sur ces sites, les terres de surface ont pu évoluer naturellement sous l'effet de phénomènes tels que la dégradation ou le lessivage. Ces phénomènes conduisent à ce que les anglo-saxons nomment "weathering of soils", ce que l'on peut traduire par le terme de "vieillissement des terres". Ainsi, dans une dernière partie consacrée à la germination, l'effet de ce vieillissement sur la toxicité des terres d'ancienne usine à gaz a donc été examiné.

4.1.5. Effet du vieillissement sur la phytotoxicité des terres d'anciennes usines à gaz

A l'occasion du suivi d'un dispositif pilote de phytotraitement des terres d'anciennes usines à gaz G1 et G2 en conditions climatiques naturelles, dispositif présenté dans le chapitre 3, la phytotoxicité des terres après 2 ans et demi d'évolution a pu être analysée. Ces résultats ont ensuite été comparés à ceux obtenus avec la terre d'un horizon végétalisé prélevé sur le site S. La germination du colza en présence de terres G1 et G2 « vieilles » ne montre ni latence ni inhibition du taux de germination quelle que soit la date (figure 13). Ces résultats sont aussi observés pour les autres espèces testées, et pour la terre S.

Ces résultats montrent que le vieillissement des terres s'est accompagné d'une disparition de leur phytotoxicité. Ces observations tendent à confirmer les travaux d'Alexander & Alexander (1999, 2000) sur l'évolution de la génotoxicité de sols contaminés par des HAP au cours du temps. Ils montrent également que le vieillissement des terres est un phénomène favorable à l'implantation de végétaux.

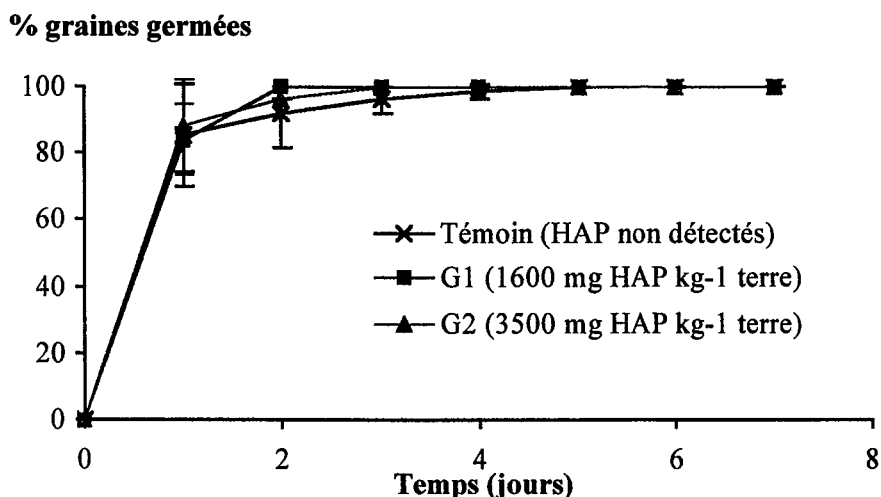


Figure 13 : Germination du colza en présence de terres d'anciennes usines à gaz G1 et G2 prétraitées et de la terre agricole témoin.

4.1.6. Conclusions

La première étape du développement de végétaux en présence de HAP, la germination, a été étudiée. Les tests de germination ont mis en évidence une phytotoxicité plus ou moins élevée des terres d'ancienne usine à gaz, certaines espèces végétales étant cependant quasi indifférentes à la présence de contamination. Les espèces de la famille botanique des Graminées sont les plus résistantes. La phytotoxicité du goudron, de sa fraction volatile et des HAP de moins de 3 cycles a été mise en évidence. Les HAP de plus haut poids moléculaire ne sont pas phytotoxiques. Une phase de vieillissement permet cependant de supprimer la phytotoxicité des terres d'ancienne usine à gaz. Cette phase de prétraitement pourrait s'avérer nécessaire pour pouvoir implanter un couvert végétal sur les terres les plus phytotoxiques.

Après avoir étudié les modalités de la germination des espèces en présence de différentes matrices contenant des HAP, la sensibilité des espèces végétales à la présence de contamination a été examinée au cours des phases ultérieures du développement. Ces études ont été conduites grâce à la réalisation de tests de croissance de courte durée.

4.2. Effets de différentes matrices contenant des HAP sur la croissance des espèces végétales

Suite à l'étude de la germination, la croissance des espèces végétales cultivées a été examinée en présence successivement de terres d'anciennes usines à gaz, de goudron et de HAP purs.

4.2.1. Croissance des espèces cultivées en présence de terres d'anciennes usine à gaz

Les espèces végétales de type grande culture ont été cultivées pendant 2 mois en vases de végétation en présence des terres d'anciennes usines à gaz G1 et G2. Leur croissance a été régulièrement évaluée par la hauteur des plantules.

4.2.1.1. Cinétique de croissance

La mesure régulière des hauteurs des plantules, non destructrice, a permis de tracer les courbes de croissance des espèces testées en présence de terres d'anciennes usines à gaz et en présence de terre agricole utilisée comme témoin.

Pendant les deux premières semaines, les taux de croissance de l'orge sur G1 et sur le témoin ont été identiques, tandis que celui des plantules poussant sur G2 était, dès le départ, très inférieur à celui du témoin (figure 14). Après 15 jours, le taux de croissance des plantules sur G2 est resté faible et constant. Le taux de croissance des plantules témoin et de celles poussant sur G1 a légèrement diminué entre 15 et 30 jours. Après 30 jours, les taux de croissance sur le témoin et sur G1 sont proches. Le taux de croissance des plantules sur G2 est significativement inférieur à celui des plantules témoin.

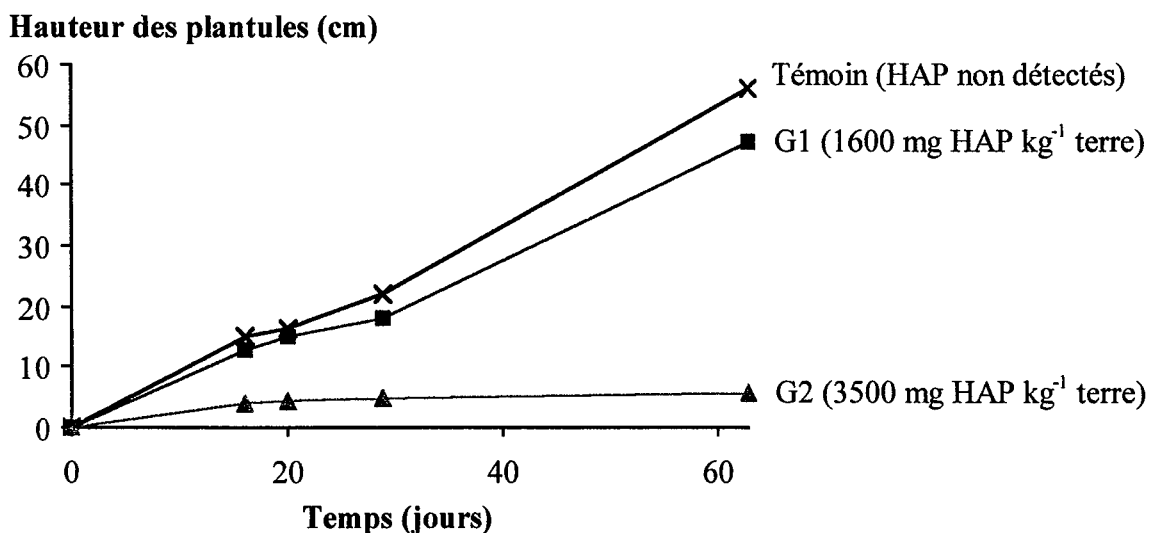


Figure 14 : Courbes de croissance de l'orge en présence des terres d'anciennes usines à gaz G1 et G2 et de la terre agricole témoin. Les écart-types sont inférieurs à la taille des marques.

Des effets sur la croissance, comparables à ceux observés pour la germination, sont donc mis en évidence. Cet effet pourrait être soit le résultat d'une toxicité des produits polluants présents dans la terre (effet direct), soit la conséquence d'un déficit nutritionnel (effet indirect), soit la résultante de ces deux phénomènes.

* Effets indirects

La présence de goudron dans la terre modifie ses propriétés, en particulier vis à vis de la porosité, du facteur hydrique et de la fertilité. Le goudron colmate les pores du sol ce qui limite l'accessibilité à l'air et à l'eau (Vercamer *et al.*, 1996). De plus, il confère au sol des propriétés d'hydrophobicité, donc une moins bonne rétention en eau. Toutefois, un arrosage précis des vases de végétation et une surveillance constante ont permis de garder une humidité quasi constante des terres.

Par ailleurs, les terres d'anciennes usines à gaz sont des milieux nutritivement déséquilibrés. Le manque de substances nutritives pourrait expliquer une croissance réduite des végétaux. Cependant l'apport de fertilisants ne modifie pas cet état de fait. Nous pouvons donc supposer que ce manque de nutriments n'est pas suffisant pour expliquer les différences de croissance observées. Toutefois, il faudrait pouvoir vérifier que les nutriments ajoutés ne sont pas passés sous forme non biodisponible sous l'effet de processus non déterminés dans les terres d'anciennes usines à gaz.

* Effets directs

Après absorption, de nombreux composés présents dans le sol ont pu induire une phytotoxicité. Des symptômes de toxicité, tels que la prolifération de racines et des nécroses sont par exemple observés.

* Cumul d'effets directs et indirects

Les symptômes de toxicité traduisent un effet direct, mais celui-ci a aussi pu s'accompagner d'effets indirects. En effet, l'intégrité du système racinaire étant altérée, une modification de sa capacité à absorber l'eau et les nutriments a pu avoir lieu. Cette modification étant répercutée au niveau de la croissance. Cette hypothèse sera discutée plus loin dans ce chapitre.

La croissance des espèces n'a pas été suivie jusqu'à maturité, puisque le but des tests de croissance était de sélectionner, rapidement, des espèces capables de croître sur les terres d'AUG. Dans cette optique, la réalisation de l'ensemble du cycle de développement de la plante n'était pas un facteur déterminant.

Ainsi, rien n'indique que, comme pour la germination, le taux de croissance des plantules poussant en présence de terre d'anciennes usines à gaz ne soit pas par la suite égal à celui des plantules témoins. Les travaux de Chaîneau (1995) ont dans cette optique montré que l'inhibition constatée en début de croissance des espèces est restée constante ou a diminué en cours de croissance, toutes les plantes arrivant à maturité. Ces résultats suggèrent que les phases initiales de croissance sont les plus sensibles à la présence d'hydrocarbures, quelle que

soit la plante. La limitation de la durée du test à un mois ne serait pas dans cette optique un frein à la mise en évidence du phénomène étudié. Dans le cas considéré, les effets de toxicité indirects, sur l'état nutritionnel de la plante en particulier, ont peu de chances de s'atténuer au cours du temps. De plus, la mise à fleur et la constitution des semences sont deux périodes du développement végétal où la nutrition est un facteur clé. Par conséquent, il est probable que des inhibitions apparaissent à ce stade du développement. Cet aspect resterait à vérifier lors de cultures plus longues. En ce qui concerne les effets directs de toxicité, comme la sensibilité de la plante peut varier, il est possible que ceux-ci s'atténuent au cours du temps, ce qui rejoindrait les travaux de Chaîneau (1995).

4.2.1.2. Hauteurs des plantules des différentes espèces après 2 mois de culture

Quelle que soit l'espèce, la hauteur des plantules est significativement inférieure en présence de terre d'ancienne usine à gaz G1 ou G2 par rapport au témoin constitué de terre agricole ne contenant pas de HAP (figure 15). La hauteur des plantules ayant poussé sur la terre G2 est significativement inférieure à la hauteur de celles ayant poussé sur la terre G1.

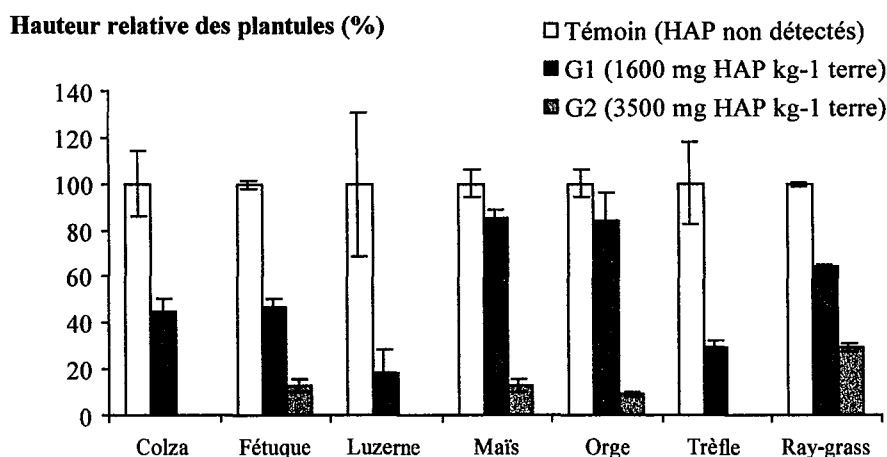


Figure 15 : Hauteurs des plantules des différentes espèces, mesurées après 63 jours de culture en vases de végétation remplis de terre d'ancienne usine à gaz G1 et G2 ou de terre agricole témoin. Résultats exprimés % de la hauteur des plantules ayant poussé sur la terre témoin.

Les espèces appartenant à la famille des Graminées, l'orge et le maïs en particulier, sont les plus résistantes. Ainsi, la hauteur des plantules sur G1 et G2 atteint respectivement 84% et 9% de celle des plantules témoin pour l'orge et 80% et 11% pour le maïs. Les Légumineuses et le colza sont les espèces les plus sensibles. En effet, la hauteur des plantules sur G1 et G2 atteint respectivement 45 et 0 % de celle des plantules témoin pour le colza, 23% et 0% pour le

trèfle. Cette sensibilité différenciée, déjà observée au niveau de la germination, est donc en accord avec les travaux d'Udo & Fayemi (1975), Terje (1984), Huzelbos *et al.*(1993) ou Chaîneau (1995).

De même que pour la germination, l'impact du goudron sur la croissance des espèces a ensuite été étudié.

4.2.2. Croissance de l'orge et du colza en présence de goudron

Des plantules de colza et d'orge ont été cultivées 1 mois en présence de terre agricole (témoin) ou de terre agricole contaminée par 2 concentrations de goudron compatibles avec la germination des espèces.

Un effet du goudron sur divers paramètres de croissance de l'orge et du colza est mis en évidence après 1 mois . Le tableau 9 illustre ces résultats.

Tableau 9 : Caractérisation de la croissance des plantules d'orge et de colza cultivées en présence de différentes concentrations de goudron et sur de la terre agricole sans goudron.

	Nb feuilles	Hauteur (cm)	MF racines (g)	MF feuilles (g)	PA/PR
ORGE					
Témoin	4,6 a	33,5 a	5,8 a	6,7 a	1,14 a
0,2% goudron	4,2 a	33,3 a	4,6 a	5,0 b	1,15 a
1% goudron	3,3 b	24,0 a	3,3 a	3,4 b	1,09 a
COLZA					
Témoin	3,2 a	14,5 a	1,3 a	4,1 a	3,49 a
0,2% goudron	2,7 a	11,1 a	0,5 b	2,6 ab	6,55 a
1% goudron	2,1 a	7,2 a	0,1 b	0,7 b	5,83 a

Pour chaque espèce, les valeurs d'une même colonne affectées de lettres différentes sont significativement différentes, n=3 et p=0,05 ; Nb feuilles : nombre de feuilles; MF racines : matière fraîche des racines; MF feuilles : matière fraîche des parties aériennes; PA : parties aériennes; PR : parties racinaires.

Une concentration de 1% de goudron dans la terre agricole diminue significativement le nombre de feuilles des plantules d'orge. Quelle que soit la concentration en goudron, la production de biomasse aérienne est significativement diminuée, tandis que la production de biomasse racinaire et la hauteur des plantules ne varient pas significativement. Toutefois, pour ce dernier paramètre, les résultats obtenus montrent une nette différence de taille entre les plantules ayant poussé sur la terre témoin et celles ayant poussé en présence de 1% de goudron. Le paramètre PA/PR est peu modifié.

Une concentration de 1% de goudron dans la terre agricole inhibe de manière significative la production de biomasse aérienne et surtout racinaire du colza, ainsi que le nombre de feuilles et la hauteur des plantules. Le paramètre PA/PR augmente de plus de 50%.

Ces résultats montrent donc que le goudron a une action phytotoxique sur la croissance des espèces. La sensibilité de la croissance est supérieure à celle de la germination. En effet, aux concentrations pour lesquelles la germination n'est pas inhibée par le goudron, la croissance est inhibée. Cette observation confirme ainsi les résultats obtenus par Chaîneau (1995) quant à la germination et la croissance de diverses espèces en présence de fuel.

Des signes de phytotoxicité des terres d'ancienne usine à gaz et du goudron sur les racines et les parties aériennes de diverses espèces ont été mis en évidence : prolifération des racines, nécroses. Ces signes plaident en faveur d'une action biologique directe des hydrocarbures. La fraction volatile est probablement responsable des symptômes de toxicité aériens, vraisemblablement aussi de ceux mis en évidence au niveau des racines.

Le goudron a une forte action phytotoxique sur la croissance des espèces cultivées, supérieure à celle observée pour la germination. Des signes de toxicité sont observés sur les racines.

Dans la suite du travail, une recherche spécifique de toxicité a été conduite grâce à l'utilisation de HAP purs représentatifs des 16 HAP EPA.

4.2.3. Croissance des espèces en présence de HAP purs

Les produits susceptibles d'avoir un effet sur la croissance ont été choisis en fonction des résultats des tests de germination. L'utilisation du naphthalène, très volatil, dans de bonnes conditions n'étant pas assurée, le phénanthrène, molécule moins volatile mais relativement soluble dans l'eau et de petite taille a été choisi. Cette molécule est de plus couramment utilisée comme modèle car 1) elle est présente à de fortes teneurs dans les sols, 2) nombre de molécules présentant une partie de leur squelette basé sur le phénanthrène sont cancérogènes et 3) c'est le plus petit HAP présentant à la fois une « bay-region » et une « K-region » (Bezalel *et al.*, 1996), dont la présence a des implications non négligeables sur la réactivité de ces molécules. L'effet du phénanthrène sur la croissance d'une plante, le maïs, a donc été étudié, dans une gamme de concentration tenant compte des capacités de rétention du sol utilisé.

Quelle que soit la concentration à laquelle il est apporté dans la terre agricole, le phénanthrène ne présente aucun effet sur le déroulement de la croissance des plantules de maïs, évaluée par le suivi de la hauteur des plantules (figure 16). Toutefois, en présence d'une concentration égale à 10 fois la concentration de base, la croissance semble ralentir plus tôt.

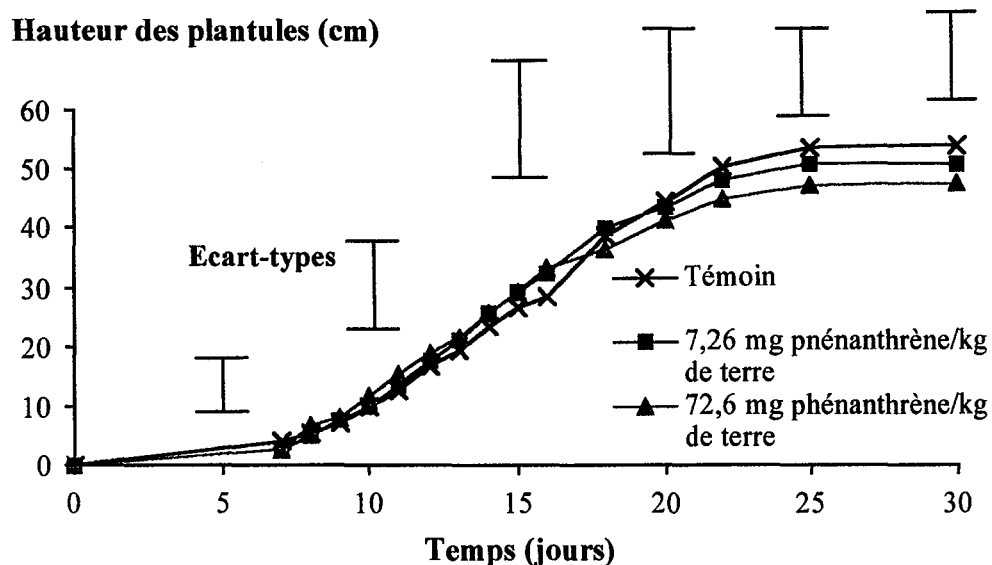


Figure 16 : Courbes de croissance du maïs en présence de terre agricole sans phénanthrène ou de terre agricole contaminée par du phénanthrène. Nb : Les courbes de croissance du maïs en présence de 1,72 mg phénanthrène kg^{-1} terre et 3,63 mg phénanthrène kg^{-1} terre sont comprises entre celle du témoin et celle à la concentration de 72,6 mg phénanthrène kg^{-1} terre.

Ces résultats confirment donc ceux obtenus pour la germination en montrant l'absence d'effet du phénanthrène. Il s'agit cependant d'une molécule particulière, qui n'est pas forcément représentative de l'ensemble des HAP EPA. Toutefois, des études complémentaires non présentées ici avaient conduit aux mêmes résultats avec des molécules de plus haut poids moléculaire comme le benzo[a]anthracène, le benzo[a]pyrène et le dibenz[a,h]anthracène. Par ailleurs, si les phénomènes d'adsorption au sol ont été théoriquement pris en compte dans le calcul des concentrations de phénanthrène apportées, on ne peut cependant pas exclure que le produit ait pu être non biodisponible au cours du test.

4.2.4. Conclusions

La germination et la croissance de différentes espèces végétales en présence de HAP ont été étudiées. Les résultats obtenus ont montré que les HAP purs, à l'exception du naphthalène, n'étaient pas phytotoxiques. Les goudrons d'anciennes usines à gaz ont quant à eux une forte action phytotoxique, due à leur fraction volatile, contenant du naphthalène. La toxicité diminue et disparaît à la suite du vieillissement du sol. Dans ce cas, la colonisation du sol par les végétaux est assurée, comme le confirme l'existence d'une flore variée sur les sites d'anciennes usines à gaz.

Cependant, si le développement des espèces semble assuré, les paramètres liés à la colonisation de ce sol par les racines, sont aussi des facteurs dont dépend la réussite d'un phytotraitement. Le paragraphe suivant présente donc, dans cette optique, les résultats d'un test visant à étudier le développement racinaire en présence de terres d'anciennes usines à gaz. Ce test, développé initialement pour l'étude de la colonisation racinaire de matériaux contaminés par des métaux lourds (Schwartz *et al.*, 1999), a été adapté à l'étude d'une contamination organique.

4.3. Etude du développement du système racinaire du ray-grass en présence de terres de site d'ancienne usine à gaz

4.3.1. Production de biomasse

Les données relatives à la croissance du ray-grass sont regroupées dans la tableau 10.

Tableau 10 : Matière fraîche aérienne (MFfeuille), racinaire (MFrac) et rapport de la biomasse aérienne à la biomasse racinaire après culture de ray-grass sur les rhizotrons pendant 1 mois : effet de la modalité de remplissage.

Tt	Description	MFfeuille (g)	MFrac (g)	PA/PR
1	Inclusions terre agricole	22,4 b	-	-
2	Inclusions terre G2	26,3 ab	-	-
3	Inclusions terre G1	23,5 b	-	-
4	Zone terre G1 au milieu	29,2 a	15,9 B	1,8 b
5	Zone surface terre agricole	23,6 b	14,9 B	1,6 b
6	Zone surface terre G1	29,5 a	19,5 A	1,5 b
7	Homogène terre G1	17,5 c	16,3 a	1,1 c
8	Homogène terre agricole	22,6 b	10,1 b	2,2 a

Tt : traitement; - : donnée non mesurée; les valeurs d'une même colonne affectées de lettres différentes sont significativement différentes, n=3 et p=0,05. Des tailles de lettres différentes dans une même colonne font référence à 2 analyses de variance distinctes.

La production de biomasse aérienne moyenne est comprise entre 17,5 g de matière sèche pour les rhizotrons de terre d'anciennes usines à gaz homogène (traitement 7) et 29,5 g de matière sèche pour les rhizotrons de terre agricole contenant une couche de terre d'ancienne usine à gaz en surface (traitement 6). Le rendement est significativement plus élevé pour les traitements 4 et 6, rhizotrons constitués d'une couche de 5 cm de terre d'AUG G1 dans la terre agricole. La production de biomasse pour l'ensemble des modalités avec inclusions de

terre (traitements 1, 2 et 3), ainsi que pour les rhizotrons de terre agricole homogène (traitement 8) ou en surface (traitement 5) est du même ordre.

La production de racines des rhizotrons de terre agricole homogène et des rhizotrons de terre G1 homogène suit le schéma inverse de la production de biomasse aérienne. La masse de racines mesurée pour les rhizotrons présentant une couche de terre G1 en surface est supérieure à celle des rhizotrons pour lesquels cette couche est à 5 cm de profondeur. Il n'y a pas de différences significatives entre les deux traitements présentant la terre agricole en surface, indépendamment du type de terre présente en dessous. La quantité totale de racines produites est fonction du type de terre dans les cinq premiers centimètres, ce qui correspond à la zone de densité racinaire maximale pour le ray-grass.

La valeur du rapport PA/PR mesurée pour les rhizotrons de terre G1 homogène est inférieure de moitié à celle mesurée pour les rhizotrons homogènes de terre agricole. Ceux de l'ensemble des traitements comportant des superpositions de terres différentes ne sont pas significativement différents et sont intermédiaires entre ceux des rhizotrons homogènes. Dans tous les cas, lorsque le rhizotron est au moins en partie constitué de terre G2, le rapport PA/PR diminue significativement.

Si le traitement homogène de terre agricole est pris comme référence, la quantité de matière sèche aérienne produite par unité de biomasse racinaire diminue en présence de terre G1, ce qui montre que le fonctionnement de la plante est altéré. En présence de terre G1, le compartiment racinaire se développe ainsi aux dépens du compartiment foliaire.

La morphologie du système racinaire du ray-grass a donc ensuite été étudiée, afin d'identifier les modalités ayant conduit à une augmentation de la masse de racines.

4.3.2. Morphologie du système racinaire du ray-grass sur terre agricole et terre d'anciennes usines à gaz

4.3.2.1. Description de l'architecture racinaire du ray-grass

Sur la terre G1, la morphologie du système racinaire montre un nombre de racines plus important que sur la terre agricole (photographies 3 et 4 et figures 17 à 24). Ces racines sont beaucoup plus fines que sur la terre agricole et présentent un chevelu racinaire secondaire plus développé. Ces différences de morphologie décrites pour les rhizotrons de terre homogène sont aussi observées au niveau des couches et inclusions des autres rhizotrons. On note ainsi une plus grande ramification des racines et une prolifération de racines fines dans la terre G1 où qu'elle soit située. Cette prolifération de racines peut être l'indice d'une phytotoxicité des terres considérées.

Les mécanismes conduisant à la prolifération des racines dans des terres non polluées et ne présentant aucun obstacle à leur développement ne sont pas intégralement connus. Il en est de même de ceux conduisant à une prolifération anormale, en réponse par exemple à un stress. Toutefois, une prolifération des racines peut être observée dans certains cas particuliers développés ci-après.

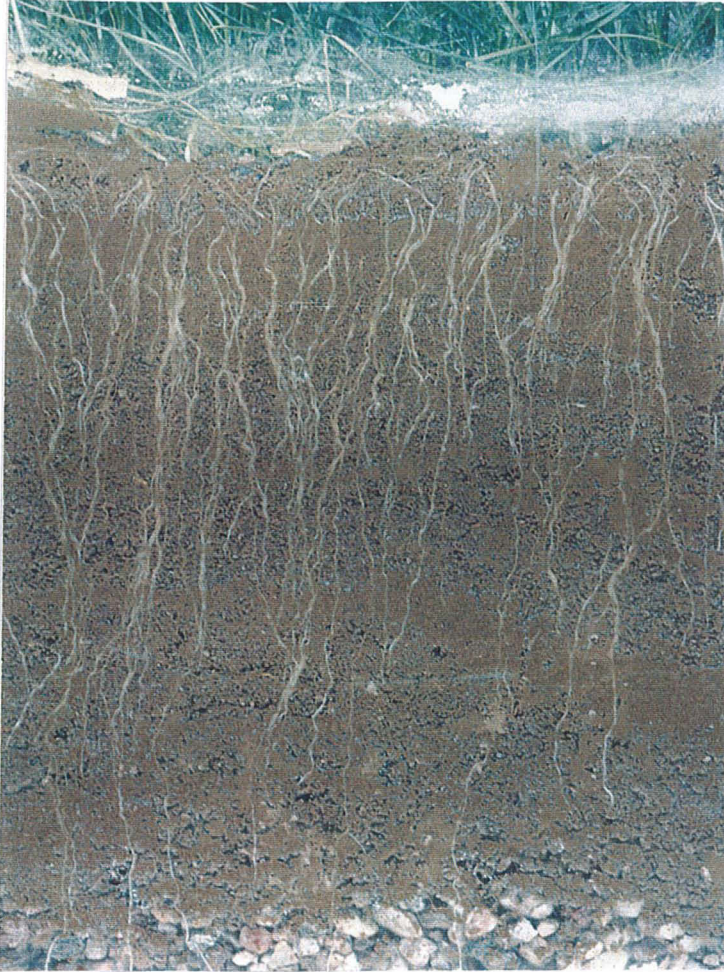
4.3.2.2. Discussion quant aux mécanismes de la prolifération racinaire

4.3.2.2.1. Fertilité des terres

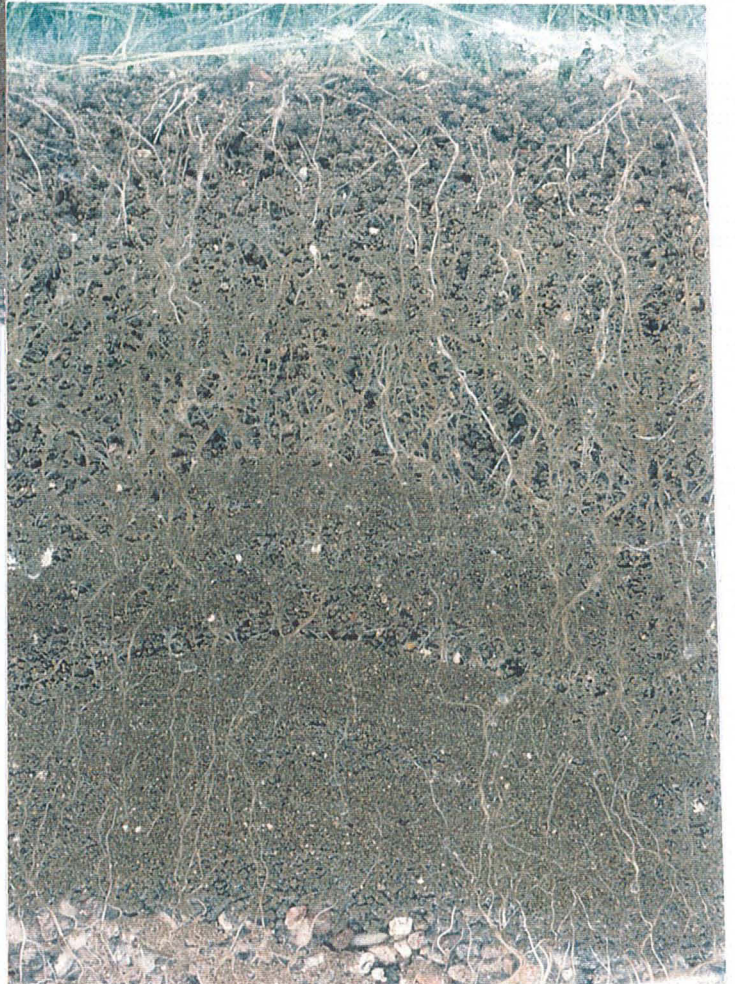
De nombreux auteurs ont décrit une prolifération racinaire dans des zones bien pourvues en nutriments et l'augmentation de prélèvement de nutriments qui en découle (Hodge *et al.*, 1999). Ce phénomène est interprété comme une adaptation à l'hétérogénéité de la fourniture dans le sol. Cette stratégie est en particulier développée par les Graminées, comme l'ont décrit les travaux de Paterson & Sim (1999). Cependant, dans le cas où une zone de terre agricole, de fertilité supérieure, est située à proximité, le ray-grass ne la colonise pas préférentiellement et la prolifération racinaire a lieu dans la terre G1. Il est donc probable que l'aspect nutritionnel ne soit pas seul responsable de la prolifération racinaire, à moins qu'à l'inverse de la stratégie citée plus haut, le ray-grass n'ait adopté une stratégie pour compenser le déséquilibre nutritionnel par une augmentation de la surface de contact sol-racine, donc de la capacité d'absorption. Précisons toutefois que l'apport de nutriments n'est pas suivi de la disparition des symptômes précédemment décrits.

4.3.2.2.2. Compaction des terres

La compaction de la terre est un facteur de stress de la plante qui peut se traduire par une prolifération des racines. Cette prolifération est en général anarchique, contrairement à celle que nous observons. L'architecture racinaire est globalement respectée et c'est le nombre de racines de chaque ordre qui est multiplié. De plus, les 3 terres utilisées ont la même densité et les rhizotrons ont été remplis de la même manière, ce qui exclut l'existence de couches compactes.



Photographie 3 : Développement racinaire sur un rhizotron de terre agricole homogène.



Photographie 4 : Développement racinaire sur un rhizotron de terre AUG G1 homogène.

Figure 17 : Traitement 1

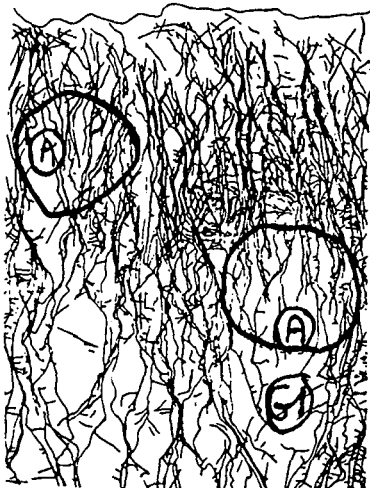


Figure 20 : Traitement 4

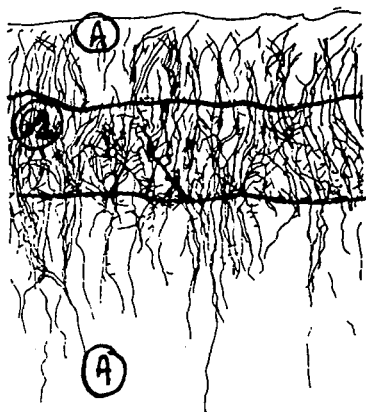


Figure 23 : Traitement 7



Figure 18 : Traitement 2

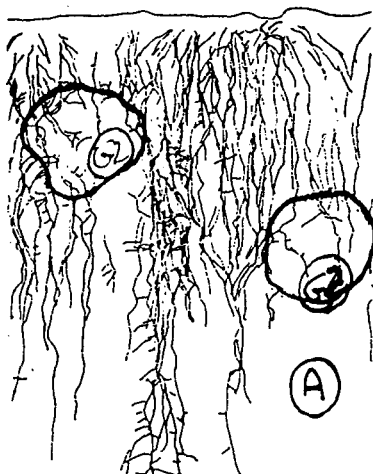


Figure 21 : Traitement 5

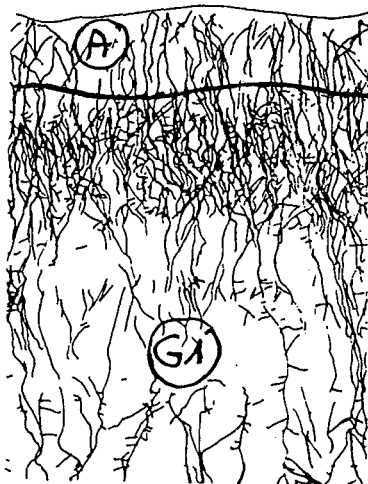


Figure 24 : Traitement 8

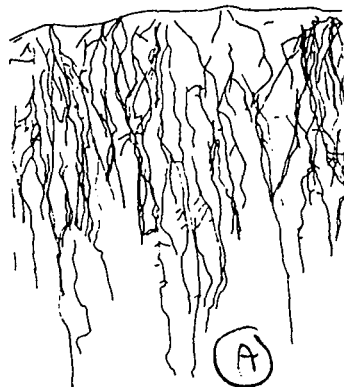
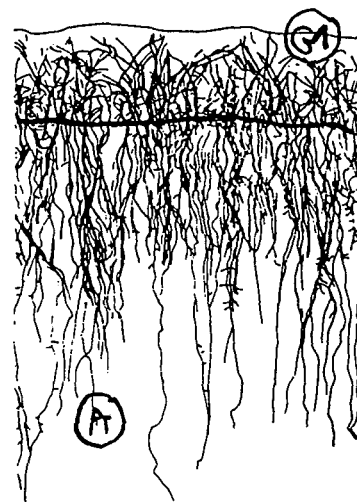


Figure 19 : Traitement 3



Figure 22 : Traitement 6



A = AGRICOLE
 GA = TERRE AUG G1
 G2 = TERRE AUG G2

Figures 17 à 24 : Développement racinaire du ray-grass après 1 mois sur les différents rhizotrons.

4.3.2.2.3. Toxicité chimique

Elle pourrait être due à la surabondance de certaines espèces chimiques comme le sodium ou le calcium, ou à la présence de polluants, bien que l'on ne puisse pas alors en préciser le mode d'action. Si cette hypothèse était vérifiée, la prolifération serait une réaction spécifique à la présence de la contamination et pourrait ainsi faire l'objet d'un test d'évitement facile à mettre en œuvre. Cette réaction spécifique rejoindrait ce que Schwartz *et al.* (1999) ont pu décrire sur le comportement différentiel du système racinaire d'un hyperaccumulateur de zinc et cadmium, *Thlaspi caerulescens*, en présence ou absence de métal et constituerait la première mise en évidence du genre.

4.3.2.2.4. Modification de la balance des hormones végétales

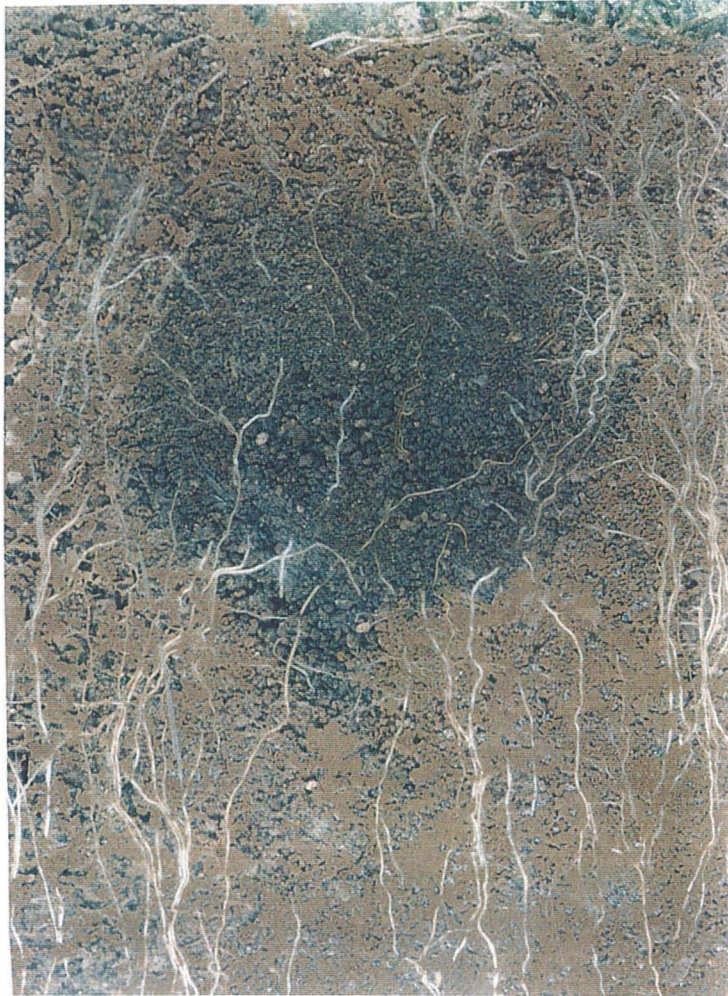
La division et l'élongation cellulaire conduisant à l'induction et à la croissance des racines sont sous le déterminisme de diverses hormones végétales. Toute perturbation des équilibres existants entre les différentes hormones se traduit par des modifications de ces mécanismes. Les symptômes visibles qui en découlent sont des modifications de croissance des racines ainsi qu'une modification du nombre de leur ramifications. Par exemple, les travaux de Vaughan & Ord (1990) sur la phytotoxicité des acides organiques ont montré que des acides carboxyliques mono-hydroxylés sont des cofacteurs de l'enzyme responsable de l'oxydation de l'acide indole-acétique (IAA), ce qui a pour conséquence d'augmenter la destruction de l'auxine et donc de diminuer la croissance.

Au niveau de la terre G1, la longueur et le nombre de racines principales et de ramifications sont supérieurs à ceux observés sur la terre agricole. Il se pourrait donc que certains composés présents dans cette terre aient induit, via leur action au niveau de la balance des diverses hormones, une stimulation des mécanismes conduisant à la production de nouvelles racines et à leur élongation. Cette hypothèse se trouverait alors confortée par l'absence de développement anarchique constatée au niveau du système racinaire.

L'architecture racinaire du ray-grass présente donc un aspect différent selon le type de terre où il se développe. Parallèlement à ces mesures et à ces observations, la prise en compte par le ray-grass de l'hétérogénéité de la teneur en contaminants et de leur répartition horizontale et verticale a été examinée.

4.3.3. Développement des racines en relation avec l'intensité et la localisation de la contamination

Il est illustré par les figures 17 à 24. Au niveau des rhizotrons présentant des taches de terre fortement chargée en HAP et molécules volatiles (traitement 2), on note un très faible développement racinaire dans les taches, voire un effet de contournement (photographie 5). Les racines ont en outre un aspect très particulier : en zig-zag, sortant de la tache ou poussant vers le haut.



Photographie 5 : Développement racinaire du ray-grass au voisinage d'une inclusion de terre d'AUG G2 dans la terre agricole.

Ce résultat montre une colonisation différentielle suivant la nature et/ou le niveau de contamination. Les zones non ou moyennement contaminées semblent être préférentiellement colonisées au détriment des zones très contaminées. Or, la prise en compte de l'hétérogénéité de la contamination est un résultat déterminant de l'efficacité du phytotraitement des terres d'ancienne usine à gaz, donc des conditions de sa mise en œuvre. Les résultats obtenus indiquent qu'à ce niveau, il sera vraisemblablement nécessaire, d'une part, d'écarter les terres

trop fortement contaminées, et, d'autre part d'effectuer un travail d'homogénéisation de ces terres avant la mise en place du traitement.

4.3.4. Conclusions

L'étude du développement racinaire du ray-grass dans un dispositif de rhizotrons a montré une modification de son développement global de cette espèce en présence de terre d'anciennes usines à gaz G1. Celle-ci induit une prolifération des racines de la plante au détriment de la production de biomasse aérienne. Cette étude a aussi révélé la colonisation différentielle des matériaux par le système racinaire d'une graminée, les moins contaminés étant préférentiellement colonisés.

5. Conclusions

Les terres d'anciennes usines à gaz ont une action inhibitrice sur la germination et plus particulièrement sur la croissance de nombreuses espèces végétales, la sensibilité dépendant de l'espèce testée. La toxicité sur les parties aériennes du végétal semble être en majorité due à la présence de nombreuses molécules volatiles dans les goudrons, au nombre desquelles le naphthalène, dont la toxicité a été vérifiée à l'état isolé. Les HAP de plus fort poids moléculaire que le naphthalène n'induisent pas de phytotoxicité. L'utilisation de rhizotrons a permis de montrer que 1) les terres d'AUG perturbent également le développement racinaire d'une graminée, le ray-grass et 2) que celui-ci évite les zones de forte contamination en HAP au profit de zones peu ou pas polluées. De ce fait, le traitement des terres d'AUG par phytoremédiation devra vraisemblablement être conduit de la même manière qu'un traitement par bioremédiation simple, sur des terres excavées, triées pour en écarter les terres trop fortement contaminés et homogénéisés.

Au cours de ces travaux, les résultats obtenus pour les espèces sauvages ont été semblables à ceux obtenus avec des espèces cultivées, et ont de plus contribué à souligner les difficultés de maîtrise de leur cycle cultural. Pour ces raisons, les espèces utilisées dans la suite de ce travail seront choisies dans le lot des espèces de grande culture, principalement à l'intérieur de la famille des graminées, du fait de leur résistance plus élevée. Des espèces appartenant à la famille des légumineuses, bien que plus sensibles, ont cependant été employées du fait de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique et de leur demande réduite en fertilisants.

A l'exception du facteur «espèce», l'ensemble des tests n'a pas permis de mettre en évidence de plantes particulièrement adaptées à la présence de HAP dans la terre. Pour la suite des expériences, les espèces ont donc été choisies sur d'autres critères. Etant donné l'objectif final

des travaux, qui est la phytoremédiation, les critères les plus significatifs sont apparus être ceux liés à un itinéraire technique réduit et à la colonisation racinaire du sol. Les espèces (résistance aux paramètres climatiques défavorables) ont donc été privilégiées, ainsi que les espèces pérennes, et dont la profondeur atteinte par le système racinaire et la densité racinaire étaient élevées. Pour ces raisons, les graminées prairiales rustiques ont été considérées comme répondant parfaitement à ces critères ainsi que les légumineuses telles que la luzerne ou le trèfle, traditionnellement utilisées dans les prairies de fauche, seules ou en association avec des graminées.

Les études de phytotoxicité ont donc permis de déterminer les grands types d'espèces végétales adaptées pour la poursuite des objectifs. Elles ont aussi permis de fixer des conditions restrictives à la mise en œuvre du traitement des terres d'AUG par les végétaux. Ces conditions restrictives sont relatives à la préparation des terres. Une condition restrictive supplémentaire pourra être également fixée au niveau des végétaux. Dans le cadre de la limitation des risques d'exposition aux HAP et de la limitation des coûts de traitement des terres, les végétaux devront en effet être secondairement sélectionnés sur leur capacité à ne pas transférer les HAP vers leurs parties aériennes. L'étude des conditions et modalités du transfert sont ainsi détaillées dans le chapitre 2.

Chapitre 2 : Transfert de HAP vers le végétal

1. INTRODUCTION

Dans le cadre de leur requalification, certains sites d'ancienne usine à gaz pourraient supporter une activité humaine. Or les HAP, dont certains sont suspectés avoir des propriétés mutagènes et cancérigènes, sont susceptibles d'être transférés du sol vers les végétaux. De l'existence d'un transfert découle un risque de contamination de la chaîne alimentaire. D'autre part, dans le cadre de la phytoremédiation, un transfert de HAP vers les plantes en quantités non négligeables aurait deux types de répercussions :

- Le traitement par phytoremédiation doit permettre d'atteindre des concentrations conduisant à un risque acceptable pour les usagers du site.
- L'étude du transfert des HAP vers le végétal pourrait être une étape préliminaire à l'étude de la transformation in-vivo des HAP. Cette fraction transformée non au niveau du sol mais au niveau du végétal, pourrait, selon son importance, contribuer à l'efficacité du traitement.

L'objectif de ce chapitre est donc de quantifier le transfert de HAP et d'en étudier les modalités, notamment grâce à l'utilisation de molécules marquées au ^{14}C . Une plante modèle, présentant un développement racinaire et une transpiration élevés, ainsi qu'une croissance particulièrement rapide, a été choisie pour ces études. Il s'agit du maïs. Le transfert a d'abord été étudié en conditions hydroponiques, dans des conditions où les HAP sont totalement biodisponibles, puis dans des sols, pour simuler les conditions réelles.

2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. Absorption d'eau et de solutés par les végétaux

Chez les végétaux supérieurs non épiphytes, le lieu de l'absorption de l'eau et des solutés est la racine, essentiellement au niveau de l'assise pilifère portant les poils absorbants. Ceux-ci sont des cellules allongées de 0,7 à 1 mm de longueur et de 12 à 15 μm de diamètre à paroi fine (figure 25). Ils sont présents en nombre élevé (de 200 à 500 par cm^2 avec un maximum de 2000 par cm^2 chez les graminées), ce qui augmente considérablement la surface de contact avec le sol et donc la surface d'absorption de l'eau et des solutés.

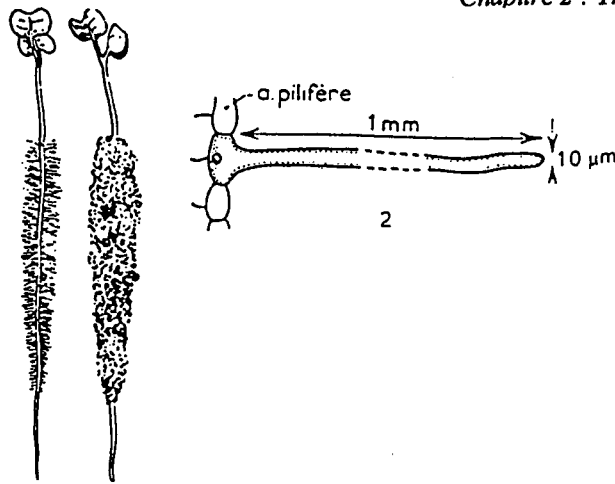


Figure 25 : Plantule de moutarde blanche (*Sinapis alba*) et détail d'un poil absorbant (d'après Heller *et al.*, 1977).

L'absorption de l'eau par la racine découle de l'existence de pressions différentielles entre le sol et les diverses zones de celle-ci. Au niveau des poils absorbants, la pression osmotique des vacuoles est supérieure à la pression osmotique externe du fait de la présence d'ions et d'acides organiques. Ce phénomène d'hypertonie crée un appel d'eau. L'eau migre ainsi passivement du sol dans le poil absorbant, entraînant avec elle certaines espèces dissoutes. Au niveau des tissus internes, la pression osmotique des vacuoles, les forces d'imbibition des colloïdes présents dans le cytoplasme des cellules et les phénomènes de transpiration et de cohésion de l'eau assurent la continuité du phénomène de succion, maintenant ainsi le gradient osmotique qui conduit au passage ultime de l'eau dans les vaisseaux conducteurs du xylème (Figure 26).

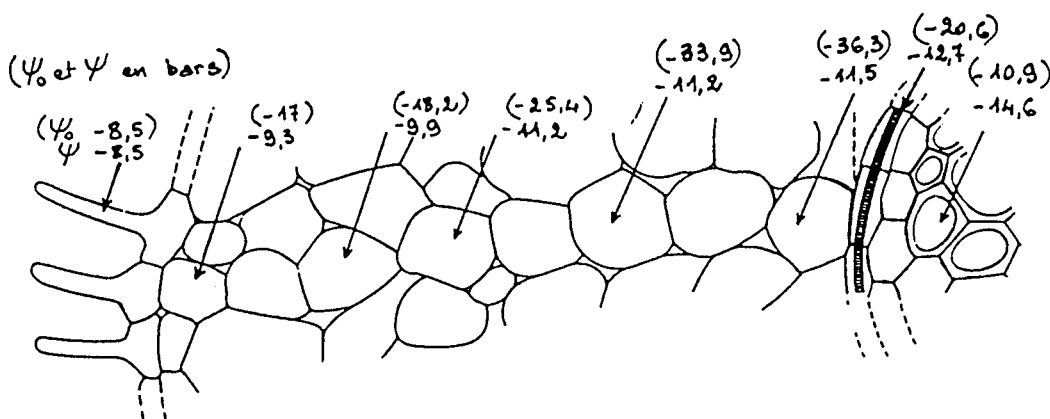


Figure 26 : Coupe transversale de racine montrant l'évolution du potentiel osmotique ψ_0 et du potentiel hydrique ψ .

La circulation de l'eau emprunte 3 voies : la voie de l'apoplasme, la voie du symplasma et la voie de circulation de vacuole à vacuole (Figure 27).

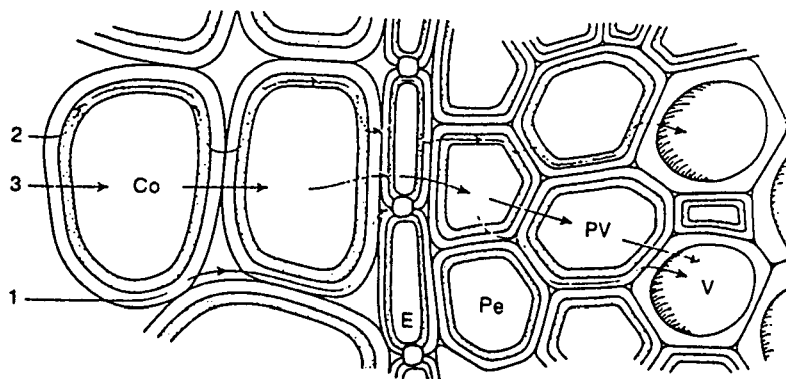


Figure 27 : Voies de passage de l'eau et des espèces dissoutes dans la plante (d'après Heller *et al.*, 1977). 1) apoplasme, 2) symplasma, 3) de vacuole à vacuole. Co : cellules du cortex; E : endoderme; Pe : péricycle; PV : parenchyme vasculaire; V : vaisseau conducteur.

L'apoplasme est constitué des parois pecto-cellulosiques des cellules, des méats et lacunes entre les cellules et des vaisseaux du xylème. La circulation de l'eau au niveau des parois y est facile, ainsi que la diffusion passive des solutés. En effet, les parois pecto-cellulosiques sont perméables car leurs constituants forment un maillage laissant de nombreux vides. Les méats et les lacunes offrent peu de résistance à l'eau, de même que les vaisseaux du xylème, qui sont des tubes creux. La zone corticale de la racine contient ainsi "l'espace libre apparent" qui occupe 10-20% du volume de la racine (Nye & Tinker, 1977). La voie apoplastique est la voie de migration principale jusqu'aux zones subérifiées de l'endoderme, qui constitue une barrière aux propriétés hydrophobes (Sattelmacher *et al.*, 1998).

Le symplasma est l'ensemble des cytoplasmes des cellules, reliés entre eux par des plasmodesmes, sortes de pores situés dans la paroi des cellules. Ces plasmodesmes laissent passer l'eau mais filtrent les solutés notamment en fonction de leur taille. Cette voie devient obligatoire au niveau de l'endoderme. Les espèces dissoutes ayant traversé cette zone subérifiée franchissent ensuite la paroi cellulaire puis le plasmalemma selon quatre processus :

- la diffusion simple, selon un gradient de concentration,
- la diffusion facilitée, à travers des canaux constitués de protéines enchâssées dans le plasmalemma,
- l'action de transporteurs, molécules amphiphiles situées au sein de la membrane et agissant par des relations de type enzyme-substrat

- et grâce à des pompes ioniques.

2.2. Barrières végétales : conséquences sur les possibilités de pénétration et de mobilité des HAP dans la plante

Le devenir d'un HAP arrivant au niveau d'une barrière dépend des propriétés physico-chimiques du composé (poids moléculaire, constante de dissociation,...) et de l'affinité des différents constituants de la barrière pour la molécule considérée. Ainsi, plus cette affinité est grande, plus le HAP sera stocké dans ce compartiment et moins il aura de chance de progresser dans le végétal, à moins d'une saturation des capacités d'adsorption de la barrière.

2.2.1. La cuticule

La cuticule est présente sur toutes les structures aériennes non lignifiées. Elle est composée d'une couche superficielle, l'épicuticule, constituée de cires, et d'une couche plus profonde, constituée de cutine et de cires (Figure 28).

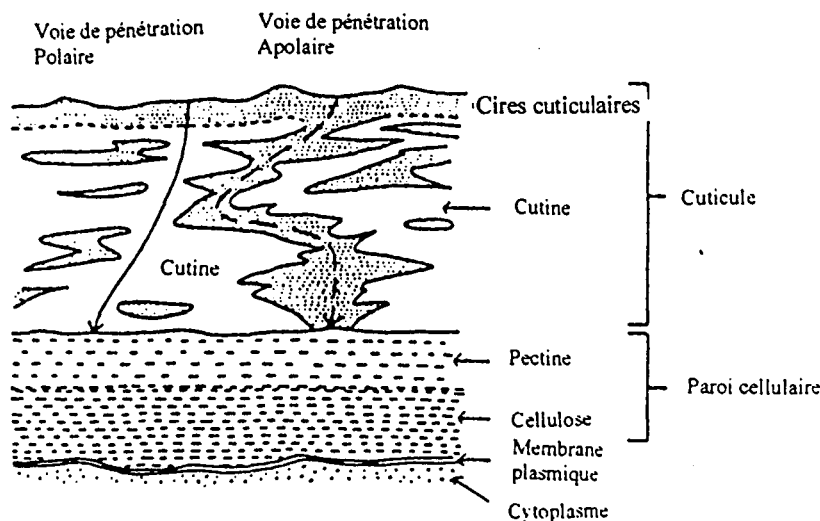


Figure 28 : Barrières des parties végétales aériennes (d'après Goodman *et al.*, 1992).

La quantité d'épicuticule varie fortement d'une espèce végétale à l'autre. La quantité totale peut atteindre 4% du « poids vert » et 15% du poids sec de la feuille soit une couche de 50 μg par centimètre carré de surface foliaire (Eglinton & Hamilton, 1967). Les cires sont constituées d'un assemblage complexe de monomères comprenant des alcanes à longues chaînes, des alcools, des cétones, des aldéhydes, des acétals et des acides (Eglinton & Hamilton, 1967). La cutine, autre composé de la cuticule, est un bio-polyester, polymère peu polaire constitué de deux familles d'acides gras hydroxylés et époxydés. Ces deux familles sont respectivement constituées d'acides gras en C_{16} et d'acides gras en C_{18} (Kolattukudy, 1980). Les cires constituent un pôle hydrophobe. La cutine est un polymère relativement hydrophile donc

susceptible d'exclure le passage des HAP. L'architecture de la cuticule (figure 28) détermine ainsi deux voies d'entrée des xénobiotiques, selon leur polarité (Sabljic *et al.*, 1990; Goodman *et al.*, 1992; Wild & Jones, 1992). Les HAP, molécules très lipophiles, sont susceptibles d'atteindre les parois cellulaires par la voie des cires. Elles sont aussi fortement susceptibles d'y être retenues, tout comme au niveau de la cutine, par des liaisons de Van der Waals ou des liaisons covalentes. La composition de la cuticule gouvernera par conséquent le passage des xénobiotiques (Baur, 1997; Baur *et al.*, 1997). Celui-ci peut varier selon les stades de développement de la plante car la composition de la cuticule évolue au cours du temps (Eglinton & Hamilton, 1967).

2.2.2. La subérine

La subérine est le polymère constitutif des barrières protectrices des parties souterraines, des surfaces blessées et de certains organes internes, comme le cadre de Caspary. C'est un polymère proche de la lignine, riche en fonctions phénoliques et aromatiques (Kolattukudy, 1980; Kolattukudy *et al.*, 1972, 1975). Du fait de sa nature de polyester, la subérine se comporte comme un faible échangeur de cations. La subérine constitue, bien qu'elle soit proche de la lignine qui est un polymère à caractère hydrophile, l'un des pôles lipophiles des limites cellulaires au niveau des racines, susceptible de permettre l'adsorption des HAP aux surfaces racinaires (Briggs *et al.*, 1982; Schwab *et al.*, 1998).

2.2.3. Les parois pecto-cellulosiques

Elles sont présentes au niveau de toutes les cellules y compris au niveau des poils absorbants et des cellules stomatiques. Au niveau racinaire, elles constituent le compartiment majeur de l'apoplasme (Heller *et al.*, 1977). Ces parois peuvent se comporter comme un piège physique à molécules, grâce aux mailles des polymères constitutifs, ou chimique par la liaison aux constituants. Il semble qu'en dessous d'un poids moléculaire de 500 g mol^{-1} , il n'y ait pas de rétention. Parmi les trois polymères constitutifs, un est relativement polaire, la pectine, et les deux autres de polarité moyenne (polymères de sucres), l'hémicellulose et la cellulose (Goodman *et al.*, 1992). La perméabilité et la capacité de rétention de ces composés vis à vis de xénobiotiques lipophiles n'est pas documentée.

2.2.4. La membrane plasmique

Cette barrière régule la mobilité de l'eau et des solutés dans la plante. Le plasmalemmes est constitué d'une bicouche lipidique dans laquelle s'enchâssent entièrement ou partiellement des

protéines. La géométrie de cette membrane est variable. Les deux propriétés gouvernant le passage d'espèces chimiques à travers la membrane plasmique sont la lipophilicité, traduite par le coefficient de partition eau-octanol ($\log K_{ow}$) et la constante de dissociation pK_a (Bromilow *et al.*, 1989, 1990; figure 29). Les HAP présentent des $\log K_{ow}$ supérieurs à 3,3 et ne sont pas ionisés. Par conséquent ces molécules sont peu susceptibles de traverser la membrane plasmique. La mobilité des molécules ayant franchi le plasmalemme serait ainsi réduite et confinée à l'apoplasme des vaisseaux du xylème, à même d'en adsorber une partie.

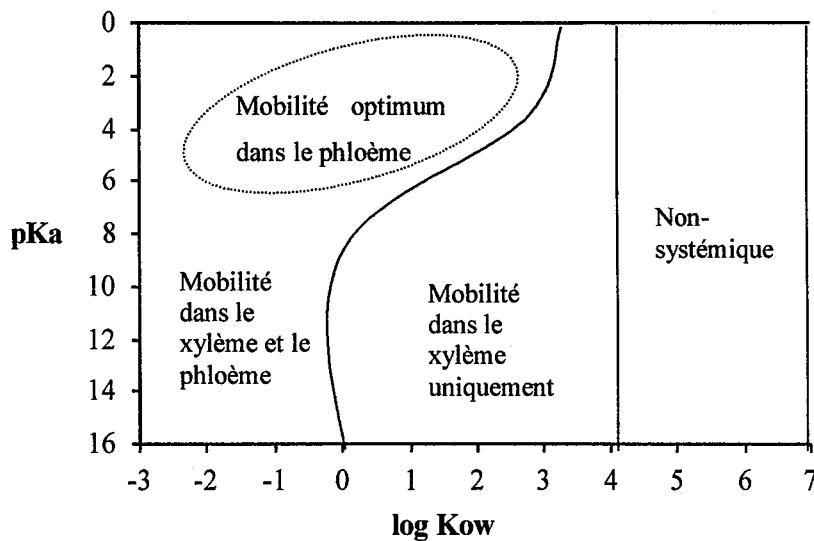


Figure 29 : Relations entre la constante de dissociation (pK_a) et le $\log K_{ow}$, en regard de la systémicité des xénobiotiques.

2.3. Absorption racinaire de molécules organiques et de HAP

L'entrée de molécules organiques dans la racine peut se faire par des processus de type passif, basés sur le flux transpiratoire et le phénomène de diffusion, ou par des processus actifs, faisant intervenir des structures spécialisées ou non (Ryan *et al.*, 1988). Dans le premier cas, le phénomène d'entrée peut être corrélé de manière nette avec les propriétés physico-chimiques de la molécule considérée. Dans le cas des HAP, la littérature ne fait pas état de l'existence de transporteur. Etant données les propriétés des molécules et des composés cellulaires considérés, l'entrée de ces composés dans la racine se fait probablement par effet d'entraînement suivant le flux hydrique.

Des corrélations ont été développées par un certain nombre d'auteurs pour décrire le prélèvement racinaire. Ces corrélations sont décrites par des facteurs de concentration. Le Root Concentration Factor (RCF) est égal au rapport de concentration de la molécule dans les

racines et la solution du sol (Shone *et al.*, 1974). Les études conduites par Briggs *et al.* (1982, 1983) sur l'absorption de composés non-ionisés marqués au ^{14}C par les racines de plants d'orge ont montré que les RCF mesurés étaient corrélés aux caractéristiques physico-chimiques des composés, en particulier à la lipophilicité, exprimée par le log Kow (Figure 30) :

$$\log(\text{RCF}-0,82) = 0,77 \log \text{Kow} - 1,52 \quad (\text{Briggs } et al., 1982).$$

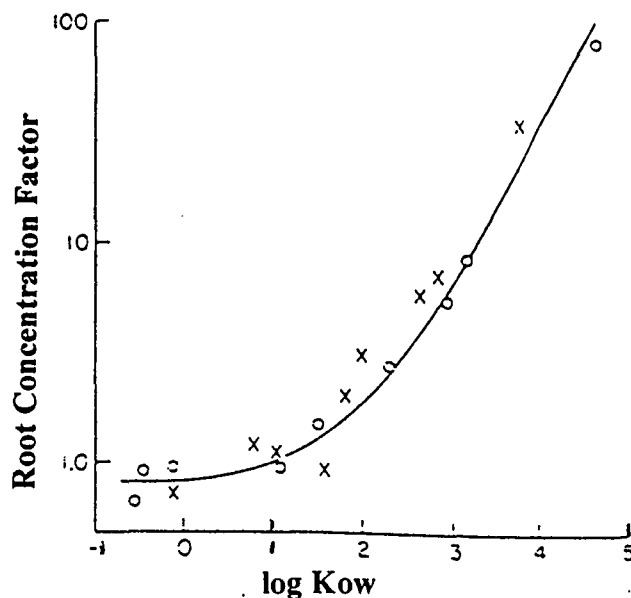


Figure 30 : Relation entre le Root Concentration Factor et le log Kow de molécules xénobiotiques (d'après Briggs *et al.*, 1982).

Le RCF des composés lipophiles est élevé, ce qui traduit l'affinité des constituants cellulaires pour ces composés (Ryan *et al.*, 1988). D'autre part, les résultats obtenus sont équivalents pour des racines vivantes ou mortes, ce qui montre que le passage de molécules organiques dans la racine résulte probablement de la simple partition de celles-ci entre la solution du sol et les composés lipophiles de la racine (adsorption) plus que d'une absorption au sens strict (Briggs *et al.*, 1982). Ce type de modélisation est une simplification basée sur des données expérimentales qui prend en compte des molécules ayant un log Kow inférieur à 4,5. C'est en particulier le cas des pesticides, qui constituent la majeure partie des produits testés dans cette étude. Les HAP, de par leurs log Kow supérieurs se situent donc aux bornes de ce modèle. Cependant, la présence de HAP dans les racines de plantes poussant sur des terrains contaminés par des HAP (Wild & Jones, 1991; Schwab *et al.*, 1998; Topp *et al.*, 1986. Kipopoulou *et al.*, 1999) ou en présence de solution contenant des HAP (Edwards *et al.*, 1982; Edwards, 1986) a bien été mise en évidence. Les HAP y sont présents principalement sous forme adsorbée localisés dans les zones corticales de la racine et se désorbent spontanément (Wild & Jones, 1991).

La modélisation de la concentration racinaire fait appel à l'utilisation de solutions, dans lesquelles l'accessibilité des molécules testées n'est pas limitée. En présence de sols, dont les capacités de rétention des molécules lipophiles sont parfois élevées, il existe une corrélation négative entre les RCF et la capacité d'adsorption du sol, évaluée à partir de la teneur en carbone organique (Topp *et al.*, 1986; Ryan *et al.*, 1988) :

$$\text{Log RCF}_{\text{sol}} = 2,196 - 0,622 \log \text{Koc} \quad \text{Topp *et al.*, (1986)}$$

$$r^2 = - 0,838$$

avec $\text{Koc} = (\text{g adsorbé kg}^{-1} \text{ sol/g dissous l}^{-1} \text{ eau}) \times (100/\% \text{ carbone organique})$

La biodisponibilité de la molécule est ainsi un facteur limitant du transfert.

2.4. Transfert de molécules organiques et de HAP des racines vers les parties aériennes

De nombreux auteurs ont mis en évidence le transfert de divers produits organiques dans les plantes (Briggs *et al.*, 1982; Edwards *et al.*, 1982; Edwards, 1986; Scheunert *et al.*, 1986; Ryan *et al.*, 1988; Wild & Jones, 1991 et 1992; Schroll *et al.*, 1994; Reilley *et al.*, 1996; Chaîneau *et al.*, 1997). Certaines de ces études concernent les HAP mais la majorité des comportements identifiés l'ont été grâce à l'utilisation de pesticides. Des articles de synthèse (Edwards, 1983; Sims & Overcash, 1983) font cependant état de travaux indiquant le passage des HAP dans la plante autant par la voie racinaire que par la voie foliaire, suivi d'un transfert et d'une mobilité dans la plante.

La modélisation mathématique du transfert a été effectuée par de nombreux auteurs (McFarlane *et al.*, 1987; Boersma *et al.*, 1988; McFarlane & Pfleeger, 1990; Boersma *et al.*, 1991; Lindstrom *et al.*, 1991; Corapcioglu, 1992). Ces modèles sont basés sur la représentation des flux de substances entre divers compartiments, simulant les divers tissus végétaux, et des équations décrivant le passage des substances à travers les limites des différents compartiments. A l'opposé de ces modèles, relativement compliqués, d'autres auteurs ont développé une description des phénomènes de transfert basée sur les propriétés physico-chimiques des molécules (Shone *et al.*, 1974; Briggs *et al.*, 1982; Ryan *et al.*, 1988; Wild & Jones, 1992).

Le transfert de molécules de la racine vers les parties aériennes se fait via le passage dans le xylème. Plus la lipophilicité du composé est élevée, plus l'accès au flux transpiratoire est difficile, même s'il existe un équilibre de concentration au niveau de la racine (Briggs *et al.*, 1983). D'autre part, le polluant est en contact avec les parois du xylème. Par conséquent, la translocation vers les feuilles sera fonction de la capacité des constituants pariétaux à retenir

les polluants. Ceux-ci atteindront les feuilles lorsque la capacité de sorption des vaisseaux sera saturée (Paterson *et al.*, 1990). Les constituants de ces vaisseaux se comportent comme une colonne chromatographique vis à vis de la migration des solutés (Briggs *et al.*, 1983).

Dans l'hypothèse où la mobilité des HAP dans la plante est passive, suivant le flux transpiratoire, les relations entre le flux d'eau et le transport des polluants est décrit par le Transpiration Stream Concentration Factor (TSCF) égal au rapport entre la quantité de polluant dans les parties aériennes par ml d'eau transpirée et la quantité de polluant dans la solution externe (Shone *et al.*, 1974; Briggs *et al.*, 1982; Ryan *et al.*, 1988; Wild & Jones, 1992). Le TSCF est en général inférieur à 1 pour les xénobiotiques, ce qui est l'indice d'un transport passif. D'autre part le coefficient peut être relié au log Kow par la formule :

$$\text{TSCF} = 0,784 * \exp(-(\log \text{Kow} - 1,78)^2 / 2,44) \quad (\text{Figure 31})$$

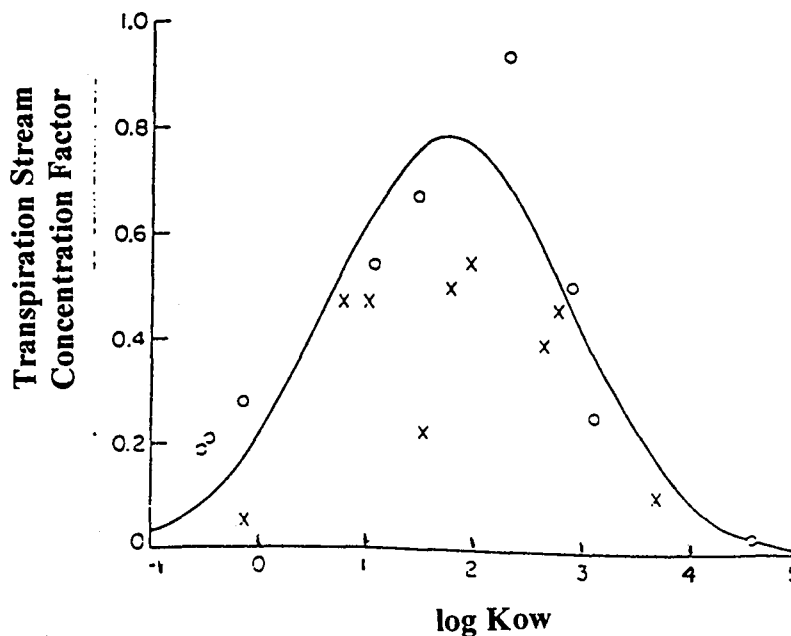


Figure 31 : Relation entre le Transpiration Stream Concentration Factor et le log Kow de molécules xénobiotiques (d'après Briggs *et al.*, 1982).

Les HAP, dont les log Kow sont supérieurs à 3,3 sont ainsi peu susceptibles d'être transférés aux parties aériennes des végétaux, d'autant plus que le passage dans la tige et le temps pour atteindre une concentration stable maximum dans la tige sont des processus très lents. Ryan *et al.* (1988) décrivent un facteur de bioconcentration : le SCF (Stem Concentration Factor) égal au rapport de la concentration dans la tige à la concentration dans la solution externe. Une relation du même type que celles décrites précédemment peut être estimée à partir de données expérimentales. Une telle relation ne décrit pas forcément la réalité car la concentration dans le

sol ou la plante est susceptible de changer selon le développement de la plante elle-même et sa capacité à dégrader le xénobiotique absorbé (Ryan *et al.*, 1988). De plus la modélisation en courbe de Gauss avec les points présentés ne semble pas forcément pertinente pour des composés comme les HAP dont le log Kow est supérieur à 3,3. Enfin, la majorité des systèmes expérimentaux utilisent des solutions nutritives. En présence de sol, la biodisponibilité des polluants est limitée et la courbe de bioaccumulation des produits est décalée au profit des composés de log Kow les plus faibles (Ryan *et al.*, 1988; Figure 32).

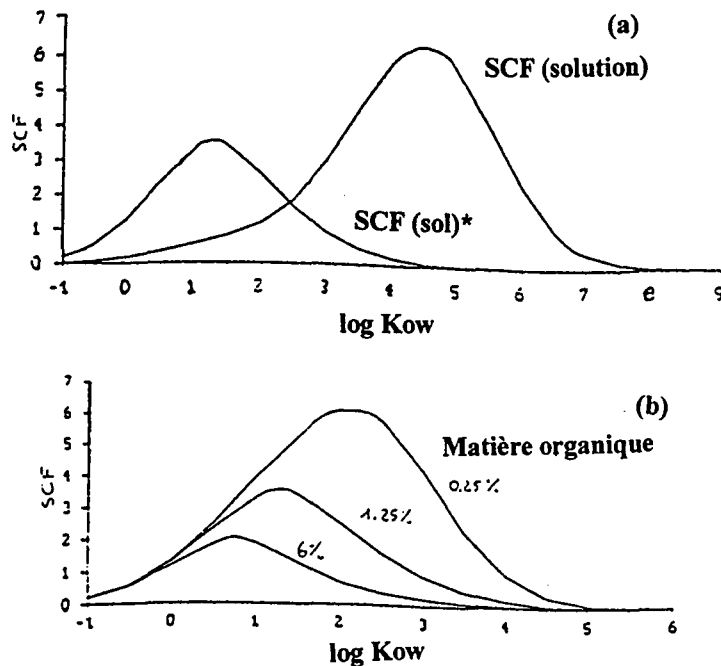


Figure 32 : (a) Relation entre le Stem Concentration Factor et le log Kow de xénobiotiques en présence de solution et de sol; (b) Evolution de la relation en fonction de la teneur en matières organiques du sol.

D'après ces résultats, le transfert de HAP aux parties aériennes à la suite d'une absorption racinaire, en particulier en présence de sol, devrait être relativement réduit. Certaines études conduites dans le cadre de l'épandage agricole de déchets confirment cette hypothèse puisqu'aux concentrations permettant la croissance du végétal testé, aucun hydrocarbure pétrogénique n'a pu être détecté dans les parties aériennes des végétaux testés (Wild & Jones, 1992; Chaîneau *et al.*, 1997).

2.5. Passage de molécules organiques et de HAP dans la plante à partir des feuilles

Les HAP sont des composés semi-volatils, présents dans l'atmosphère sous forme gazeuse et liée à des particules (Atkinson & Arey, 1992). Ils sont donc susceptibles de pénétrer dans le végétal à la suite d'une contamination des feuilles par dépôt sec ou humide de particules (Sabljić *et al.*, 1990; Keymeulen *et al.*, 1991). De plus, les précipitations fortes donnent lieu à un phénomène de "splash" entraînant un contact entre l'épiderme de la feuille et les particules de sol contaminées sur lequel les plantes se développent (Dreicer *et al.*, 1984).

La voie de pénétration foliaire pourrait ainsi être une voie de contamination majeure des végétaux par les HAP (Sabljić *et al.*, 1990; Keymeulen *et al.*, 1991) du fait 1) de la surface totale du feuillage; 2) de l'affinité des constituants présents à la surface des feuilles pour les composés lipophiles et 3) de la capacité à pénétrer sous forme gazeuse au niveau des stomates. Plusieurs observations vont dans ce sens. Ainsi, on retrouve des HAP dans des plantes, même en des lieux éloignés de toute source de production, les HAP étant transportés dans l'atmosphère (Laflamme & Hites, 1978; Ockenden *et al.*, 1998). On retrouve aussi des HAP, ainsi que des marqueurs pétroliers, issus des combustibles fossiles, dans les végétaux situés au bord des routes ou dans des zones industrielles (Larsson & Sahlberg, 1981; Bryselbout *et al.*, 1999, 2000; Kipopoulou *et al.*, 1999).

Le passage des molécules dépend de leurs caractéristiques physico-chimiques : poids moléculaire, volatilité, log Kow et volumes moléculaires (Schwarz & Jones, 1997; Kipopoulou *et al.*, 1999). Un indice, le FCF (Foliar/air Concentration Factor) est décrit par analogie avec le SCF (Paterson *et al.*, 1990). Il peut être corrélé avec la constante de volatilité des produits (constante de Henry, H) :

$$\text{Log FCF} = 1,25 \log H + 4,06.$$

2.6. Devenir des molécules xénobiotiques et des HAP dans la plante

Au niveau des cellules végétales, les xénobiotiques semblent suivre 2 voies principales : soit ils sont retenus de manière passive par les composés pariétaux, soit ils entrent dans un processus de biotransformation.

Le métabolisme des xénobiotiques (dont les HAP) dans la plante se déroule en 3 phases, analogues à celles du métabolisme animal (figure 33).

La Phase I est une phase d'oxydation, au cours de laquelle la molécule est fonctionnalisée. Cette étape est catalysée par des enzymes de type monooxygénases à cytochrome P-450

(protéines à hèmes localisées au niveau du réticulum endoplasmique) et des peroxydases (Coleman *et al.*, 1997). Elle donne lieu à la formation d'époxydes, de quinones et de phénols. La formation de diols est négligeable, à part dans le cas des algues vertes (Schoeny *et al.*, 1988; Warshawsky *et al.*, 1995). Cette capacité à métaboliser les HAP a souvent été montrée pour des cellules végétales en cultures (Harms *et al.*, 1977; Harms, 1983; Schoeny *et al.*, 1988; Warshawsky *et al.*, 1995; Schrenk & Steinberg, 1998).

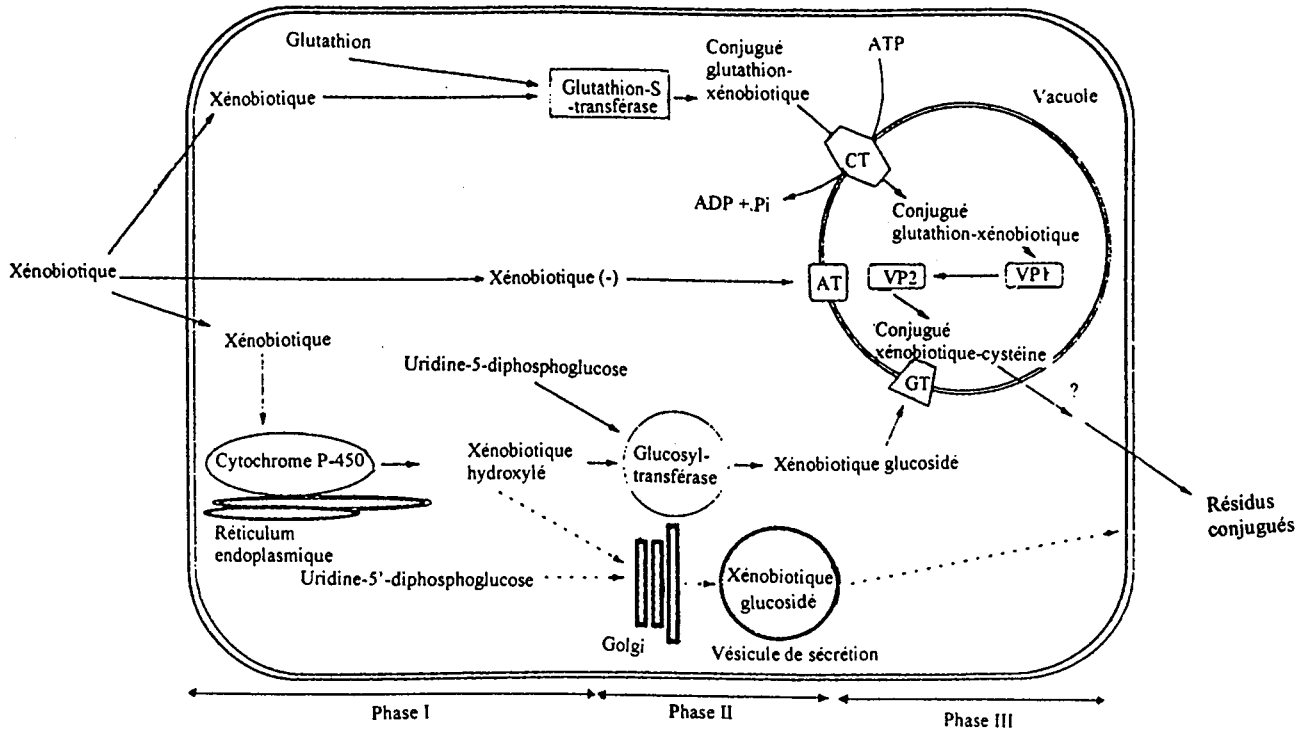


Figure 33 : Processus de détoxification des xénobiotiques dans la cellule végétale (d'après Coleman *et al.*, 1997); CT : transporteur conjugué du glutathion; AT : transporteur ATP-dépendant des xénobiotiques anioniques; GT : transporteur ATP-dépendant conjugué des glucosides; VP : peptidase vacuolaire.

Peu d'études font référence à la plante entière (Harms, 1996; Vanderford *et al.*, 1997). Les monocotylédones semblent peu métaboliser les HAP au contraire des dicotylédones comme le soja (*Glycine max*) (Schrenk & Steinberg, 1998) qui formeraient plus de résidus conjugués (Harms, 1996).

Plus hydrosolubles, les métabolites formés sont, pour certains, plus toxiques que les molécules mère (Belkin *et al.*, 1991). Les époxydes en particulier peuvent se lier aux molécules d'ADN par des liaisons covalentes avec les bases puriques ou pyrimidiques, d'où l'origine des propriétés de cancérogénicité de ces molécules. Cependant la transformation chimique

diminue les possibilités de partition dans les membranes et donc diminue la demi-vie des composés dans le végétal et le temps d'exposition (Coleman *et al.*, 1997).

Certaines transformations peuvent s'avérer être létales pour les cellules et la plante. La plante, comme l'animal, dispose donc de moyens pour détoxifier ces molécules (Coleman *et al.*, 1997). La phase II du métabolisme procède par conjugaison à diverses molécules hydrosolubles, parmi lesquelles des sucres, des acides aminés, l'acide éllagique (Sayer *et al.*, 1982) et le glutathion, grâce à l'action de glutathion-transférases. Cette molécule a un rôle central car elle est présente en grande quantités au niveau des centres de la photosynthèse, son rôle principal étant la protection contre les radicaux libres qui s'y forment. La phase III du métabolisme a pour but l'élimination du xénobiotique sous sa forme conjuguée. L'acide éllagique, dont la formule est présentée sur la figure 34, est un phénol végétal dont l'activité de neutralisation des diols est exceptionnellement élevée.

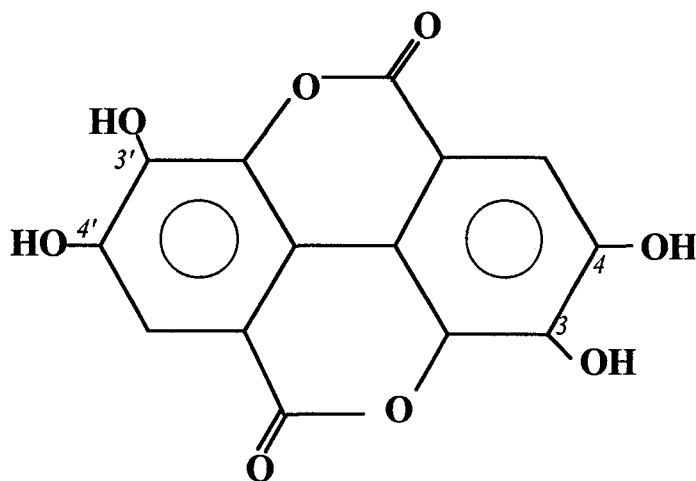


Figure 34 : Formule chimique de l'acide éllagique.

Pour les HAP, deux processus semblent co-exister : soit l'incorporation dans les constituants végétaux comme la lignine (Trenck & Sandermann, 1981; Sandermann *et al.*, 1983), soit la compartimentation dans les vacuoles (Coleman *et al.*, 1997). Les enzymes qui catalysent la polymérisation de la lignine ne sont pas spécifiques, ce qui explique que des molécules aromatiques et réactives telles que les métabolites des HAP puissent entrer dans le processus. L'immobilisation des conjugués formés dans le symplasme, dans l'apoplasme ou la vacuole fait appel à des transporteurs spécifiques enchâssés dans le plasmalemma et/ou le tonoplaste (Coleman *et al.*, 1997).

2.7. Conclusions

Les polluants comme les HAP peuvent atteindre le végétal à partir de la solution du sol ou de l'atmosphère. Leur passage dans la plante et leur mobilité dans le végétal sont conditionnés, d'une part, par leurs propriétés physico-chimiques et, d'autre part, par l'existence de barrières végétales qui interagissent avec eux.

Les HAP de plus de 2-3 cycles sont des molécules de haut poids moléculaire, de volume moléculaire élevé, très lipophiles et très peu solubles. Leur caractère lipophile leur confère une forte affinité pour divers polymères constitutifs des barrières cellulaires, les cires au niveau des feuilles ou la subérine au niveau des racines. Leurs poids et volumes moléculaires limitent leur mobilité au sein des polymères constitutifs de l'apoplasme. Leur très faible solubilité et leur absence d'acidité déterminent leur partition dans les parois des structures conductrices au détriment de la phase aqueuse ou de la sève brute. Les HAP seront ainsi trouvés préférentiellement dans les zones corticales des racines ou dans la cuticule des feuilles.

Des cellules végétales isolées métabolisent les HAP à divers degrés et/ou les détoxifient. Il semble que cette capacité soit généralisable à la plante entière, bien que le transfert du HAP jusqu'aux cellules soit alors un facteur extrêmement limitant.

Du fait de leurs propriétés, les HAP sont donc vraisemblablement peu mobiles dans la plante. Les molécules comme le naphthalène ont des propriétés situées en marge des limites données pour la mobilité dans le végétal. Elles pourraient donc être transférées dans le végétal. De même, les métabolites des HAP, qui sont des molécules parfois de plus faible poids moléculaire, présentant des fonctions chimiques réactives, solubles dans l'eau et qui ont des propriétés acides, sont, au vu des conditions discutées, fortement susceptibles d'être mobiles dans le système sol-plante. Cependant, il n'existe pas de données relatives au transfert de ces molécules, bien que leur stockage dans les végétaux pose potentiellement plus de problèmes en termes de risque d'exposition pour les individus que les molécules mères, largement moins toxiques.

La majorité des études a été conduite en conditions hydroponiques. Cependant, en présence de sol, la biodisponibilité des produits diminue d'autant plus que ces molécules sont lipophiles. Il existe ainsi un déplacement des courbes de transfert vers des valeurs de lipophilicité plus faible au détriment de molécules comme les HAP, qui ont alors peu de chances d'être transférées.

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Matériels

3.1.1. Les produits

Le phénanthrène marqué au deutérium (Phe-D₁₀) et le phénanthrène non marqué, de puretés supérieures à 99% ont été fournis par Aldrich. Le phénanthrène marqué au ¹⁴C sur le carbone 9 a été fourni par ISOTOPCHIM. Sa pureté est de 99%. La source présente une activité spécifique de 2,035 GBq mmol⁻¹. Le phénanthrène marqué au ¹⁴C sur tous les cycles a été fourni par Amersham Life Science. Sa pureté est de 98%. La source présente une activité de 4,33 GBq mmol⁻¹. Le benzo[a]pyrène, marqué sur les carbones 7 et 10, a été fourni par Amersham Life Science. Sa pureté est de 97,2%. La source présente une activité de 2 GBq mmol⁻¹.

3.1.2. La solution hydroponique

La solution hydroponique de Hewitts présente la composition suivante : KNO₃ 363,6 mg l⁻¹, MgSO₄, 7H₂O 331,2 mg l⁻¹, FeSO₄ 12,32 mg l⁻¹, NaH₂PO₄, 2H₂O 187,2 mg l⁻¹, CuSO₄, 5H₂O 2,25 mg l⁻¹, MnSO₄, 4H₂O 20,07 mg l⁻¹, H₃BO₃, 27,9 mg l⁻¹, Na₂MoO₄, 2H₂O 1,08 mg l⁻¹, ZnSO₄, 7H₂O 2,61 mg l⁻¹, NaCl 53,1 mg l⁻¹ dans l'eau distillée.

3.1.3. L'espèce végétale

Nous avons utilisé pour cette expérience le maïs (*Zea mays*) de variété DEA. Cette espèce a été choisie pour sa croissance rapide, sa masse racinaire et son volume d'eau transpirée élevés. Les semences sont calibrées (\pm 5% autour d'une moyenne) afin de s'affranchir de la variabilité due à la quantité de réserves.

3.1.4. Les terres

La terre agricole de Chenevières et la terre d'AUG G1, décrites au chapitre 1 ont été utilisées. L'échantillon de terre utilisé a été séché à l'air libre et tamisé à 2 mm avant utilisation.

3.2. Transfert de phénanthrène et benzo[a]pyrène marqué d'une solution nutritive vers les plants de maïs

Le dispositif est composé d'erlenmeyers en verre remplis de 300 ml de solution nutritive. Un dispositif en fil de fer permet de maintenir 2 grains de maïs par erlenmeyer en contact permanent avec la solution (figure 35).

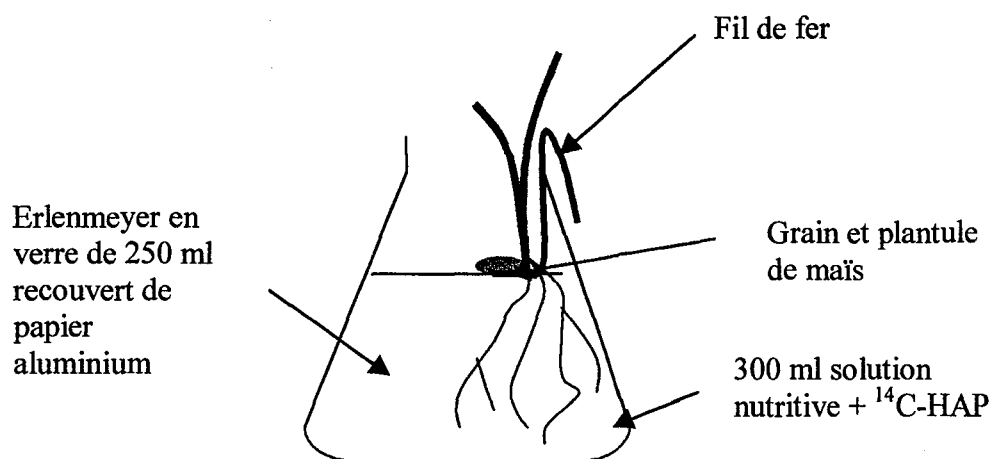


Figure 35 : Dispositif expérimental pour l'étude du transfert de HAP d'une solution nutritive vers les plantules de maïs.

3.2.1. Marquage isotopique de la solution

L'apport de HAP marqué dans la solution nutritive se fait par dissolution d'une quantité adéquate de la source, contenue dans un solvant miscible à l'eau. La concentration en phénanthrène apportée à la solution est de 909 nmol l^{-1} soit une radioactivité de $2,09 \text{ MBq l}^{-1}$. Celle en benzo[a]pyrène est de $4,63 \text{ nmol l}^{-1}$ soit une radioactivité de $0,17 \text{ Bq l}^{-1}$. La radioactivité apportée avec le phénanthrène est quarante fois supérieure à celle apportée par le benzo[a]pyrène car la très faible solubilité aqueuse de celui-ci a limité l'apport.

3.2.2. Mise en place et conduite de l'essai

Trois traitements ont été appliqués, chacun avec 4 répétitions (erlenmeyers) : 1) un témoin de volatilisation, 2) un témoin de croissance et 3) les modalités test. Le témoin de volatilisation est constitué de solution nutritive marquée sans plantules de maïs. Les modalités tests se composent de solution marquée sur laquelle on place deux grains de maïs. Le témoin de croissance est constitué de solution nutritive non marquée et des deux grains de maïs. Des prélèvements ont été réalisés à quatre dates pour l'expérience de transfert du phénanthrène (7, 14, 21 et 28 jours) et 2 dates pour l'expérience de transfert du benzo[a]pyrène (10 et 20 jours). Le dispositif se compose ainsi de 24 erlenmeyers pour l'expérience avec le phénanthrène et 16 erlenmeyers pour celle avec le benzo[a]pyrène.

Le dispositif est placé en laboratoire, sous hotte, à lumière et température ambiante. Les graines sont descendues tous les quatre jours de manière à maintenir en permanence les racines des plantules dans la solution.

3.2.3. Mesures

La radioactivité des solutions nutritives de tous les erlenmeyers est contrôlée tous les deux jours. Le comptage est réalisé dans 10 ml de scintillant (Ultima-Gold™, Packard) à l'aide d'un compteur β (Liquid Scintillation Analyzer Tricarb 2100 TR, Packard). Pour chaque erlenmeyer prélevé, la radioactivité et le volume de la solution nutritive sont mesurés. Les plantules (regroupées par erlenmeyer) sont séparées en feuilles, racines et graines. Les poids frais et sec de ces fractions sont mesurés. Les trois fractions sont rincées à l'acétonitrile, sont séchées à l'air libre, puis sont broyées dans l'acétonitrile. La radioactivité du solvant de rinçage et des extraits est mesurée. L'ensemble de ces mesures permet l'établissement d'un bilan de radioactivité.

3.3. Identification et quantification de phénanthrène marqué au deutérium dans les parties aériennes du maïs

3.3.1. Dispositif, mise en place et conduite de l'essai

Le dispositif expérimental est basé sur celui décrit par Edwards et al. (1982). Neuf flacons de verre fumé de 1 litre ont été remplis avec 1 litre de solution hydroponique. Dans six de ces 9 flacons, sont apportés 2 mg de Phe-D₁₀. Trois traitements, avec trois répétitions, ont été mis en place: a) solution contenant le Phe-D₁₀, sans maïs, jouant le rôle d'un témoin de biodégradation; b) solution sans Phe-D₁₀, avec maïs, pour contrôler la croissance des plantes; et c) solution avec Phe-D₁₀ et maïs. Des plantules de maïs, homogènes (en taille, poids et volume racinaire), pré-cultivées pendant 15 jours sur un sol agricole sans HAP, sont repiquées, après un léger rinçage des racines. Les flacons sont alors fermés par du coton et du ruban téflon. Le dispositif est placé en serre à 20°C pendant 1 mois et la perte de solution est compensée par l'ajout à la pipette chaque semaine de solution hydroponique sans phénanthrène. En cours d'expérience, l'absence d'évaporation dans les flacons sans plantules a été vérifiée.

3.3.2. Traitement des solutions en fin d'expérience

3.3.2.1. Extraction

Les solutions ont été extraites 3 fois avec 250 ml de dichlorométhane (HPLC Grade), pendant 10 min sur un agitateur automatique d'ampoules à décanter (Agitelec, J. Toulemonde & Cie). Les extraits sont ensuite concentrés sous vide. La quantité de phénanthrène adsorbée au niveau des bouchons et des parois des flacons a été évaluée. Cette quantité est négligeable.

3.3.2.2. Séparation par Chromatographie sur Couche Mince

L'objectif est de séparer l'extrait en deux fractions : une fraction apolaire contenant le phénanthrène résiduel, et une fraction plus polaire contenant les métabolites du phénanthrène éventuellement présents dans la solution. Cette séparation a été réalisée par CCM sur plaque de silice. Les plaques de silice (10 x 5 cm, Merck) ont été lavées au dichlorométhane. Le phénanthrène marqué au deutérium, ainsi que les principaux métabolites (le 9-phénanthrol, le 9,10-phénanthrène diol et la 9,10-phénanthrène-quinone) ont été utilisés comme références sur une première plaque. Chaque extrait a été parallèlement déposé sur une plaque individuelle. L'élution est faite au dichlorométhane. La plaque de référence a été analysée sous lumière UV et développée par l'acide sulfurique concentré couplé à la chaleur. Les valeurs Rf obtenues sont les suivantes : 1 pour le phénanthrène, 0,036 pour le diol, 0,524 pour le 9-phénanthrol et 0,451 pour la quinone. La migration différentielle des métabolites décrit 3 zones sur la plaque : la première, Rf (0,646 à 1) inclut les aromatiques comme le phénanthrène résiduel; la seconde, Rf (0,219 à 0,646) inclut les métabolites du type mono-alcools ou cétones et la troisième, Rf (0 à 0,219) inclut des métabolites comme les diols ou les acides. Les fractions ont été grattées sur les plaques et ont été extraites avec 3x500 µl d'éthylacétate:CH₂Cl₂ 50:50 (v:v) sur pipette Pasteur (étant donné le faible volume de silice concerné) et ont été analysées par CG-SM.

3.3.3. Traitement des plantes

Les parties aériennes, séparées des racines, ont été séchées 48h à 50°C, broyées, puis extraites successivement 3 fois avec du dichlorométhane dans un bain d'ultrasons (Branson) pendant 15 minutes. Les extraits sont ensuite filtrés sur silice (Silicagel 60, Merck) et alumine (Merck) sur pipette Pasteur, afin d'éliminer les composés tels que les cires, et ont enfin été analysés par CG-SM.

3.3.4. Conditions d'analyses par CG-SM

La chaîne d'analyse est composée d'un chromatographe en phase gazeuse (Varian Star 3400), muni d'un passeur automatique d'échantillons (Varian 8200 CX) et couplé à un spectromètre de masse de type trappe ionique (Varian Saturn 2000). Les conditions chromatographiques sont les suivantes : flux d'hélium, 11 psi; injection "on column"; colonne DB5-MS (J&W Scientific), 30m x 0,25 mm i.d., phase de 0,25 µm d'épaisseur, constituée de silice greffée par un mélange de 5% phényl-95 % méthylpolysiloxane; température du four : 30°C pendant 2 min, montée à 150°C à 15,6°C min⁻¹, 305°C à 6°C min⁻¹ puis un palier de 10 min à 305°C,

soit une durée totale de 45,52 min; température de l'injecteur : 33°C pendant 0,1 min, puis montée à 305°C à 180°C min⁻¹, puis un palier de 20 min à 305°C. Les conditions d'analyse en masse sont les suivantes : mode d'impact électronique, énergie d'ionisation de 70eV, vitesse d'acquisition d'1 scan sec⁻¹, durée d'analyse de 43 min, délai d'allumage du filament et du multiplicateur de 9,6 min, échelle de masse balayée : 100-300 uma pour les fractions aromatiques, 160-260 ou 40-300 uma pour la recherche de métabolites. La quantification est réalisée par rapport à une gamme étalon constituée de 6 concentrations de 16 HAP réalisées à partir de standards des 16 HAP dans l'heptane (0,16, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 et 8 ng ml⁻¹).

3.4. Transfert de HAP en présence de sol en chambre de culture

3.4.1. Dispositif

Le dispositif est constitué de vases de végétation en verre de 5 cm de diamètre et 10 cm de hauteur, remplis de 100 g de terre humidifiée à 80% de sa capacité au champ. La moitié des pots sont remplis de terre agricole de Chenevières, l'autre moitié est remplie par de la terre d'ancienne usine à gaz G1. Pour chaque type de terre, trois traitements sont appliqués : 1) trois répétitions de terre amendée avec du phénanthrène froid à raison de 10 mg et du phénanthrène marqué à raison de 66,7 MBq par vase; 2) trois répétitions de terre amendée en phénanthrène froid uniquement; et 3) trois répétitions de terre seule. Chaque vase de terre seule a été placé entre trois vases de terre marquée de manière à quantifier le passage par voie foliaire. Trois grains de maïs sont semés sur chaque vase. Trois dates de prélèvement ont été retenues : 3, 8 et 14 jours.

3.4.2. Apport du phénanthrène dans la terre

Deux solutions de 25 ml de dichlorométhane contenant 250 mg de phénanthrène non marqué sont réalisées. Une des solutions est ensuite amendée avec la source radioactive de manière à obtenir une concentration de 36,4 µmol l⁻¹ soit une activité de 74 MBq ml⁻¹. Pour chaque vase de végétation, 1 ml d'une des solutions est apporté sur une aliquote de 10 g de terre finement broyée à l'aide d'un broyeur à billes en acier. Le solvant est évaporé sous hotte puis l'aliquote est mélangée intimement avec les 90 g de terre restant.

3.4.3. Conduite de l'essai

Le dispositif est placé en chambre de culture dans les conditions qui ont été décrites dans le chapitre 1 pour les tests de croissance. Un arrosage journalier est conduit par pesée de chaque vase afin de maintenir l'humidité de la terre.

3.4.4. Mesures

3.4.4.1. Extraction

A chaque date de prélèvement, les végétaux sont récupérés et les matières végétales sont divisées en parties aériennes et parties racinaires. Elles sont ensuite rincées à l'acétonitrile (HPLC Grade) puis sont broyées dans un mortier. Le broyat est transféré dans un tube à centrifuger en verre de 80 ml avec 10 ml de dichlorométhane (HPLC grade), mis dans un bain d'ultrasons (Bransonic) pendant 15 min, puis centrifugé 15 min à 2000 g (Jouan). L'extrait est récupéré dans une fiole jaugée, afin d'en ajuster le volume et sa radioactivité est mesurée. Le broyat est extrait successivement jusqu'à épuisement de la radioactivité.

Chaque échantillon de terre est placé dans quatre tubes à centrifuger avec 50 ml d'eau distillée, extrait pendant 15 min dans un bain d'ultrasons puis centrifugé 15 min à 2000 g. L'extrait est récupéré dans une fiole jaugée afin d'en ajuster le volume puis sa radioactivité est mesurée. Une extraction à l'eau est réalisée afin de caractériser la fraction biodisponible, puis des extractions successives au dichlorométhane sont effectuées jusqu'à épuisement de la radioactivité extraite.

3.4.4.2. Combustion

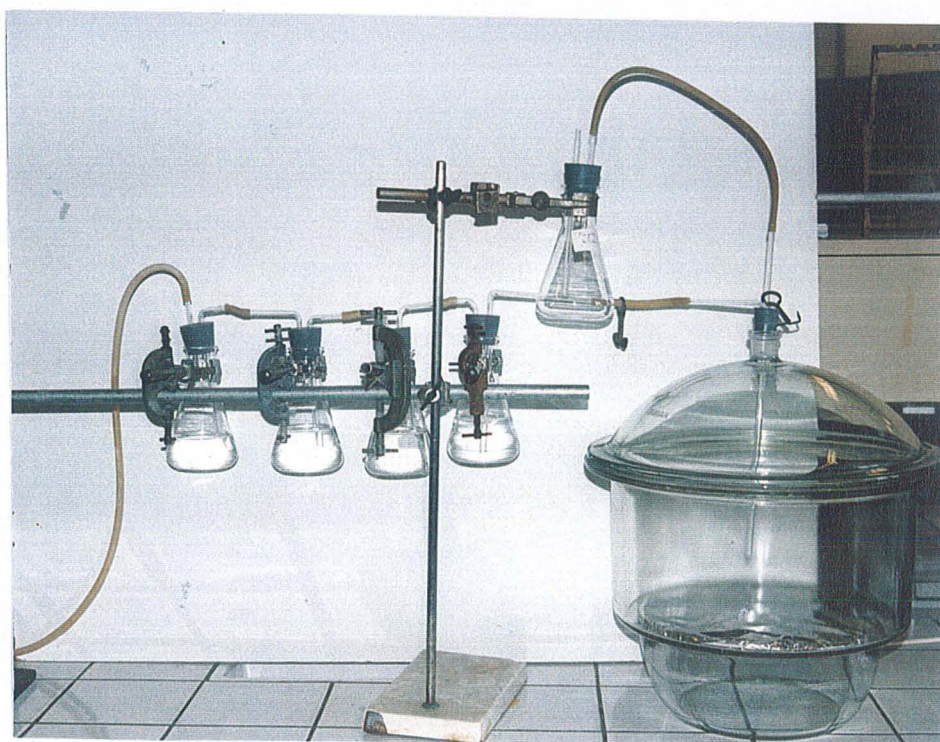
Quand le bilan est déséquilibré, une combustion des résidus d'extraction des sols et secondairement des végétaux est réalisée de manière à quantifier une fraction non extractible de produits marqués (Perrin-Ganier *et al.*, 1999). La combustion des échantillons est réalisée dans un four à combustion (H. Wösthof oHG Bochum type MRA) à 950°C sous flux d'oxygène. Le $^{14}\text{CO}_2$ est piégé dans un mélange d'éthanolamine et d'ester monométhyle de l'éthylène glycol. Le comptage est réalisé dans 10 ml de scintillant "Scintillator PlusTM" (Packard). Le rendement de combustion est calculé après apport d'une radioactivité connue sur un échantillon de végétal dont on réalise ensuite la combustion. La combustion est réalisée sur 1 g de terre dans le cas de la terre de Chenevières et 500 mg de terre dans le cas de celle d'ancienne usine à gaz.

3.5. Transfert de phénanthrène et de benzo[a]pyrène en présence de sol en enceinte fermée

3.5.1. Description du dispositif

Il est présenté par la photographie 6.

Le dispositif se compose d'un dessiccateur de verre de 30 cm de diamètre. Ce dessiccateur contient 9 vases de végétation en verre de 5 cm de diamètre et 4 cm de hauteur, remplis de 100g de terre agricole de Chenevières humidifiés à 80% de sa capacité au champ. Il est relié, via des tubes de verre de 8 mm de diamètre, à une série de pièges constitués par des erlenmeyers de 250 ml en verre, contenant pour le premier, en amont, 200 ml de soude 0,5 N destinée à piéger le CO₂ de l'air. En aval du dessiccateur, sont placés deux erlenmeyers contenant 200 ml de soude 0,5 N suivis de deux erlenmeyers contenant 200 ml d'acétonitrile. La soude est destinée à piéger le CO₂ produit dans le dispositif. L'acétonitrile est destiné à piéger les molécules organiques volatiles produites dans le dispositif. Le dispositif est relié en aval à une trompe à vide afin de faire circuler l'air. Deux chaînes sont constituées, l'une pour l'étude du devenir du phénanthrène, l'autre pour l'étude du benzo[a]pyrène.



Photographie 6 : Dispositif expérimental mis en place pour l'étude du transfert du phénanthrène et du benzo[a]pyrène à partir d'un sol vers les parties aériennes de plantules de maïs, en enceintes fermées (d'après Scheunert *et al.*, 1986).

3.5.2. Mise en place et conduite de l'essai

Pour les deux HAP, trois traitements sont réalisés, chacun avec trois répétitions : 1) la terre agricole à laquelle on apporte 32,4 µg phénanthrène marqué par vase ou 46,7 µg benzo[a]pyrène marqué par vase (366,7 MBq), 2) la même modalité avec apport de trois

grains de maïs par vase et 3) la terre agricole seule avec trois grains de maïs par vase. Pour cette dernière modalité, la terre est recouverte de papier aluminium muni d'orifices pour assurer la croissance des plantules de maïs. De cette manière, les plantules de maïs ne peuvent capter de molécules radioactives qu'à partir de l'atmosphère du dessiccateur.

Une solution de phénanthrène et une de benzo[a]pyrène sont réalisées dans l'acétonitrile. L'apport des radioéléments dans la terre est effectué par addition d'une aliquote de 2ml de solution sur une aliquote de 10 g de terre finement broyée. Le solvant est évaporé, puis l'aliquote est mélangée intimement avec le reste de la terre du vase correspondant. Trois échantillons de terre pour chaque élément constituent le temps 0.

Avant de mettre les vases de végétation dans le dessiccateur, une aération de 1h est effectuée de manière à connaître la quantité de CO₂ de l'air qui y est présente au départ. Après la mise en place du système, une aération est conduite quotidiennement pendant 30 min.

3.5.3. Mesures

Après chaque aération, la soude du piège à CO₂ d'entrée est changée. La radioactivité présente dans la soude en sortie (¹⁴CO₂) est mesurée. Suivant l'état de saturation, la soude dans les erlenmeyers est changée ou son volume est complété. La radioactivité présente dans les erlenmeyers d'acétonitrile est mesurée.

Après 16 jours, l'expérience a été arrêtée, les plantules étant attaquées par des moisissures. Les plantules ont été séparées de la terre et séparées en feuilles, racines et graines. Ces différentes fractions végétales ont été rincées à l'acétonitrile, séchées à température ambiante puis broyées dans l'acétonitrile. La radioactivité des solvants de rinçage et des extraits a été mesurée. Les résidus d'extraction des végétaux ont ensuite fait l'objet d'une combustion dont le protocole a été décrit dans le paragraphe précédent.

4. RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Transfert de HAP à partir de solutions nutritives vers les parties aériennes de plants de maïs

Des plantules de maïs ont été cultivées pendant environ un mois en présence de solution nutritive. La solution nutritive contenait soit du phénanthrène marqué au ¹⁴C, soit du phénanthrène marqué au deutérium, soit du benzo[a]pyrène marqué au ¹⁴C. Le marquage au ¹⁴C a été utilisé pour étudier les flux de radioactivité vers les différentes parties végétales

entre la germination et la fin du test. Le marquage au deutérium a été employé pour qualifier les éventuelles molécules transférées.

4.1.1. Transfert de phénanthrène

Dans une première expérience, des grains de maïs ont été apportés dans un dispositif d'erlenmeyers contenant une solution nutritive et du phénanthrène marqué au ^{14}C à l'activité de $2,09 \text{ MBq l}^{-1}$. La germination des grains puis la croissance des plantules ont été suivies pendant 28 jours.

Afin de mettre en évidence les modalités du devenir du phénanthrène, un bilan de radioactivité dans les divers compartiments du système a été réalisé.

4.1.1.1. Analyse de la radioactivité présente dans les différents compartiments végétaux

Le bilan de la radioactivité retrouvée dans les différents compartiments du système aux différentes dates de prélèvement est présenté dans le tableau 11.

Tableau 11 : Répartition de la radioactivité* dans les différents compartiments du système au cours de la croissance des plantules de maïs en présence de phénanthrène marqué au ^{14}C . Résultats exprimés en % de la radioactivité introduite.

		7 jours	14 jours	21 jours	28 jours
Solution nutritive		$40,0 \pm 3,9 \text{ a}$	$20,5 \pm 1,5 \text{ b}$	$12,3 \pm 1,9 \text{ c}$	$10,1 \pm 2,9 \text{ c}$
Feuilles	R*	$0,4 \pm 0,2 \text{ cd}$	$0,3 \pm 0,1 \text{ cd}$	$1,8 \pm 0,6 \text{ bc}$	$0,6 \pm 0,0 \text{ cd}$
	E*	$0,6 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,3$
Racines	R	$0,3 \pm 0,2 \text{ d}$	$1,3 \pm 0,1 \text{ cd}$	$2,9 \pm 0,4 \text{ b}$	$1,7 \pm 0,8 \text{ bc}$
	E	$0,2 \pm 0,0$	$0,8 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,3$
Graines	R	$0,3 \pm 0,2 \text{ bcd}$	$0,5 \pm 0,1 \text{ bcd}$	$1,1 \pm 0,1 \text{ a}$	$1,0 \pm 0,5 \text{ cd}$
	E	$2,0 \pm 0,7$	$2,0 \pm 0,6$	$5,3 \pm 2,8$	$0,5 \pm 0,2$
Dissipation (%)		$45,6 \pm 3,5 \text{ c}$	$73,0 \pm 2,7 \text{ b}$	$78,0 \pm 1,8 \text{ a}$	$82,0 \pm 2,4 \text{ a}$
Total		$99,3 \pm 9,1$	$98,9 \pm 5,3$	$102,7 \pm 8,6$	$97,7 \pm 7,4$

* Comptage direct des solutions nutritives, rinçage et extraction des parties végétales, dissipation évaluée grâce aux erlenmeyers témoin; R : rinçage; E : extractible à l'acétonitrile; lettres : analyses de variance conduites indépendamment sur les valeurs de la solution nutritive, de la dissipation et de l'ensemble des parties végétales en considérant la somme du rinçage et de l'extractible, $n=4$ et $p=0,05$.

Les quantités de radioactivité retrouvées, par rapport à la radioactivité introduite, sont en moyenne de 1,5% dans les parties aériennes, 2,8% dans les racines et 2,9% dans les graines. Ces quantités ne présentent pas d'évolution systématique au cours du temps du fait de la croissance différentielle des plantules. La quantité de radioactivité adsorbée sur le dispositif est négligeable. La quantité de radioactivité présente dans la solution diminue significativement au cours du temps du fait de la dissipation du phénanthrène. Celle-ci étant évaluée à partir des solutions témoin, sans maïs, les bilans sont équilibrés pour toutes les dates.

Une forte dissipation de la radioactivité est observée. Celle-ci pourrait être due à l'action combinée de la volatilisation et de la photo- ou bio-dégradation. A titre de vérification, une expérience complémentaire a été conduite en annexe sur un dispositif maintenu stérile par l'ajout de chlorure de mercure. Aucune différence dans la dissipation n'ayant été observée par rapport au dispositif non stérile, le phénomène de biodégradation a été considéré comme négligeable. La photo-dégradation des HAP est possible mais n'est vraisemblablement pas un facteur significatif de la dissipation comparée à la volatilisation. Le phénanthrène est en effet une molécule relativement volatile, la constante de Henry étant de $4,5 \cdot 10^3$. La volatilisation modérée d'une partie de la solution nutritive a pu par ailleurs accentuer le phénomène.

En moyenne, la quantité de radioactivité trouvée dans les racines et les graines est équivalente. Celle trouvée dans les parties aériennes est inférieure de moitié. Au niveau des racines, plus de la moitié de la radioactivité est récupérée par rinçage. Cette fraction correspond vraisemblablement à des produits simplement adsorbés à la surface des racines ou dans les zones corticales des racines. La fraction extraite au solvant correspondrait quant à elle aux produits ayant migré plus avant dans la racine. L'existence de ces deux fractions est déjà décrite dans les travaux de Wild & Jones (1991) et Schwab *et al.* (1998) sur les racines de graminées et de la carotte. La fraction adsorbée est récupérée après simple trempage de la racine dans l'eau pure par ces auteurs.

Au niveau des feuilles, la majeure partie de la radioactivité est présente sous forme extractible. Etant donné que le dispositif ne permet pas de discriminer la voie de transfert racinaire de la voie gazeuse, la fraction récupérée par rinçage pourrait provenir de la contamination par des molécules volatilisées à partir de la solution. La fraction extractible par le solvant correspondrait dans ce cas aux produits ayant pénétré dans le végétal par la voie racinaire ainsi que, éventuellement, aux produits prélevés par voie gazeuse et ayant migré plus profondément dans la cuticule des feuilles ou dans les cellules.

Afin de s'affranchir des variations d'accumulation de produits radioactifs dans les différents compartiments, nous avons ensuite calculé la teneur en produit radioactif par unité de matière sèche végétale (tableau 12).

La teneur en produits radioactifs des organes en contact avec la solution nutritive est supérieure à celle des parties aériennes. Elle augmente globalement jusqu'à 21 jours, puis elle diminue au dernier prélèvement. Ceci pourrait s'expliquer par un passage de produits préalablement adsorbés sur les racines et les graines vers la solution nutritive, dont la teneur en produits marqué a fortement diminué. Entre 60 et 70% de la radioactivité présente au niveau des racines (entre 10 et 70% pour les graines) est en effet récupérée par simple rinçage des racines (graines). Cette facilité de récupération indique l'implication de molécules faiblement retenues, comme nous l'avons discuté au niveau du paragraphe précédent. De plus, seule la radioactivité récupérée par rinçage diminue. La teneur en radioactivité extraite reste stable au cours du temps ce qui 1) pourrait traduire l'existence d'un équilibre et 2) tend à montrer que cette fraction correspond bien à une fraction absorbée par les racines.

Tableau 12 : Teneur en produits radioactifs dans les différentes parties des plantules de maïs ayant poussé en présence de phénanthrène marqué au ^{14}C dans la solution nutritive (n=4). Résultats exprimés en μg équivalent phénanthrène g^{-1} MS.

		7 jours	14 jours	21 jours	28 jours
		$\mu\text{g g}^{-1}$ MS			
Feuilles	R	1,3 ± 0,9	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,04 ± 0,01
	E	2,1 ± 1,6	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,06 ± 0,01
Racines	R	5,5 ± 2,7	9,1 ± 0,9	10,7 ± 2,1	8,1 ± 3,8
	E	3,7 ± 0,7	4,9 ± 0,7	4,5 ± 2,9	4,9 ± 1,5
Graines	R	0,4 ± 0,2	2,0 ± 0,6	2,2 ± 0,1	3,9 ± 1,8
	E	2,9 ± 1,0	8,3 ± 2,6	10,3 ± 5,5	1,9 ± 0,6

R : rinçage, E : extractible à l'acétonitrile

La teneur en produit radioactif des tiges diminue au cours du temps. Il pourrait s'agir d'un effet de dilution. La cinétique d'accumulation des produits radioactifs dans les parties aériennes comparée à celle de la production de matière sèche a donc été examinée.

4.1.1.2. Cinétique du transfert de produits radioactifs

Dans le but d'établir la cinétique de transfert du phénanthrène, le rapport de la quantité de phénanthrène accumulée (μg) chaque semaine à la quantité de matière sèche produite (g) pendant le même temps a été calculé.

Ce rapport est de $20,2 \mu\text{g g}^{-1}$ la première semaine, $7,8 \mu\text{g g}^{-1}$ la seconde semaine, $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ les troisième et quatrième semaines. Ces résultats montrent donc que la capacité d'accumulation de la plante diminue au cours du temps et confirment l'existence d'une dilution du produit absorbé dans la matière sèche produite.

Après avoir étudié la cinétique de transfert des produits radioactifs, assimilés au phénanthrène, nous avons ensuite considéré les quantités de produits correspondantes.

4.1.1.3. Quantités de phénanthrène transférées

La teneur en produit radioactif des différents extraits n'était pas suffisante pour qu'une analyse par CLHP couplée un détecteur de radioactivité soit conduite. Dans l'hypothèse selon laquelle la molécule mère seule est transférée, les teneurs moyennes de phénanthrène, rinçage et extractible confondus, présentes dans les parties aériennes et les racines des plantules de maïs seraient ainsi de $0,3$ et 15 mg kg^{-1} MS après 3 semaines. La teneur maximale des feuilles est de $3,4 \text{ mg kg}^{-1}$ MS et n'est observée qu'après 7 jours.

Les quantités de phénanthrène marqué retrouvées dans les feuilles des plantules de maïs sont plus élevées que celles couramment trouvées dans la bibliographie (Edwards, 1983).

Le modèle mathématique de Briggs *et al.* (1982) permet de prédire le transfert racinaire et aérien de molécules organiques à partir de la lipophilicité de la molécule (évaluée par le coefficient de partition eau-octanol, K_{ow}) et de son affinité pour les matières organiques (évaluée par le coefficient de partition eau-matière organique, K_{oc}). Le transfert racinaire est défini par le RCF (Root Concentration Factor), rapport de la concentration de la molécule dans les racines à la concentration dans la solution. Dans le cas du phénanthrène, le modèle de Briggs donne un RCF de 89. Le transfert aux parties aériennes est défini par le SCF (Stem Concentration Factor), rapport de la concentration de la molécule dans les parties aériennes à la concentration dans la solution. Dans le cas du phénanthrène, ce SCF modélisé est de 6,4. Nous avons calculé ces coefficients à 7 et 21 jours, dates où la teneur en phénanthrène des feuilles et respectivement des racines était la plus élevée. Les RCF sont ainsi de 0,85 et 1,4 à 7 et 21 jours. Les SCF correspondants sont de 0,31 et 0,03. Les valeurs expérimentales trouvées sont donc totalement différentes des valeurs prédites par le modèle de Briggs pourtant établi à partir de résultats concernant des systèmes hydroponiques. Cependant, les

propriétés des HAP les situent en marge du modèle. Nos résultats traduisent donc vraisemblablement 1) soit les limites de l'application du modèle, 2) soit que la démarche simplificatrice utilisant certaines propriétés physico-chimiques des molécules n'est pas adaptée dans le cas du phénanthrène. Ils montrent aussi que dans le cas du phénanthrène, les propriétés physico-chimiques utilisées par Briggs ne gouvernent probablement pas le transfert.

Ces facteurs de bioconcentration sont également supérieurs à ceux de la bibliographie. Par exemple, Edwards (1983) cite des facteurs de bioconcentration compris entre 0,001 et 0,183 pour les HAP totaux.

A l'issue de la discussion des résultats de cette expérience de transfert du phénanthrène marqué au ^{14}C , quatre questions se posent. La première concerne l'occurrence d'une dégradation du phénanthrène dans la solution. La seconde est relative à la nature des produits transférés. La troisième concerne l'aptitude de la plante à transférer le phénanthrène après la germination. Enfin, le dispositif expérimental employé, s'il a permis l'étude des flux de radioactivité dans les différents compartiments, n'a pas permis de discriminer la voie de passage par les racines de celle par l'atmosphère. Une expérience de transfert de phénanthrène marqué au deutérium a permis de répondre aux trois premières questions. Ce travail a aussi permis de mettre en évidence l'importance potentielle de la voie de transfert par la phase gazeuse.

4.1.1.4. Transfert de phénanthrène marqué au deutérium

Des plantules de maïs âgées de 15 jours ont été repiquées sur des solutions nutritives contenant ou non du phénanthrène deutéré. Ces plantules se sont ensuite développées pendant un mois dans un dispositif expérimental conçu pour isoler complètement la solution nutritive et les racines d'un contact avec l'air ambiant.

Aucun des trois métabolites principaux du phénanthrène (diol, mono alcool et quinone) n'a été détecté dans la solution nutritive, ce qui tendrait à montrer que la dégradation n'est pas un facteur significatif dans ce type de dispositif.

Après 1 mois de mise en contact, 1,4, 76,6 et 143 $\mu\text{g kg}^{-1}$ MS de phénanthrène deutéré sont quantifiés dans les parties aériennes des plantules de maïs ayant poussé en présence du produit deutéré (figure 36). Le phénanthrène deutéré n'est pas détecté dans les plantules témoin. L'existence d'une voie de transfert racinaire d'un HAP de faible poids moléculaire, le phénanthrène, chez le maïs est donc démontrée sans ambiguïté.

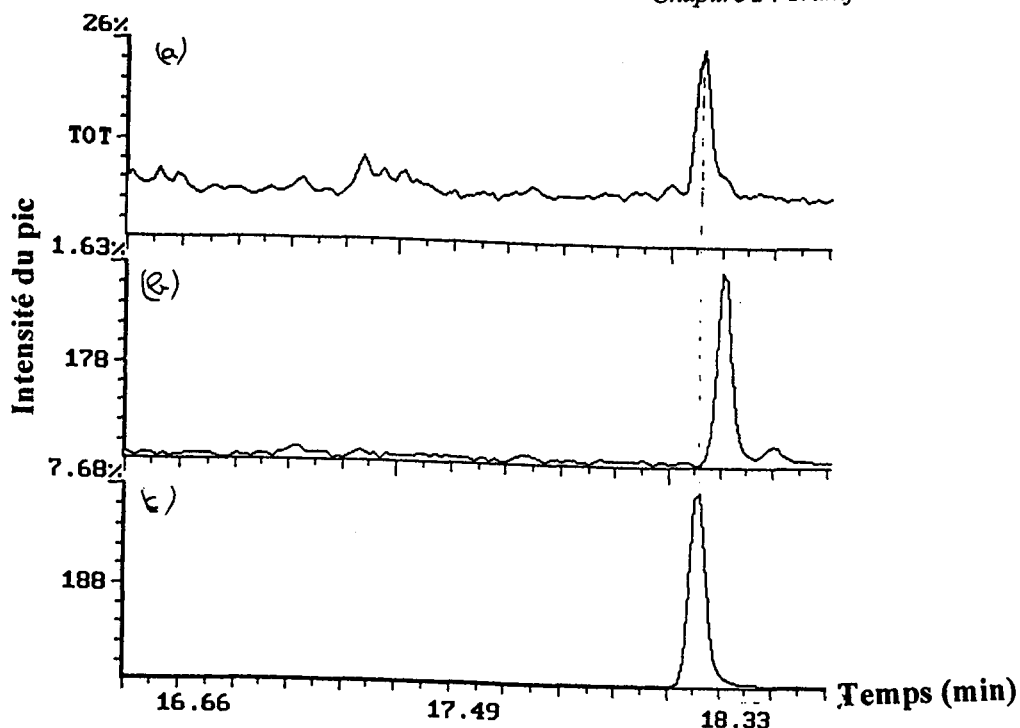


Figure 36 : Chromatogrammes d'un extrait de feuilles de maïs après 1 mois de culture en solution hydroponique en présence de phénanthrène marqué au deutérium. Analyse par spectrométrie de masse. (a) courant ionique total entre 16,6 et 19 min; (b) m/z 178 caractéristique du phénanthrène et (c) m/z 188 caractéristique du phénanthrène-D₁₀.

Ces résultats montrent de plus l'existence d'un transfert de phénanthrène pour des plantules de maïs "âgées". Ils confirment ainsi les travaux conduits dans les mêmes conditions expérimentales par Edwards *et al.* (1982) et Edwards (1986) avec l'anthracène, molécule de propriétés proches de celle du phénanthrène, et le soja ou le haricot. Ils suggèrent que le transfert est un phénomène continu au niveau de la vie de la plante. Cependant, au vu des résultats de notre expérience précédente, le taux de transfert évoluerait au cours du temps. Les phases de développement initiales de la plante seraient ainsi les plus significatives pour le passage, ce que confirme le très faible ordre de grandeur des quantités transférées par rapport à l'expérience précédente.

Enfin, des résultats complémentaires, obtenus lors de l'analyse des végétaux, viennent étayer l'existence d'une voie de contamination atmosphérique. Douze HAP non marqués ont en effet été détectés dans les parties aériennes des plantules témoin et des plantules ayant poussé en présence de phénanthrène marqué au deutérium. La quantité maximum de phénanthrène non marqué détectée est de $34 \mu\text{g kg}^{-1} \text{MS}$. Les teneurs des autres HAP varient de $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{MS}$ à $212 \mu\text{g kg}^{-1} \text{MS}$.

De telles valeurs montrent, d'une part, la puissance de l'utilisation d'un traceur pour discriminer la contamination atmosphérique et la contamination liée au dispositif

expérimental et, d'autre part, que la voie de contamination atmosphérique semble ne pas être négligeable, ce que d'autres auteurs avaient déjà souligné (Sabljic *et al.*, 1990; Keymeulen *et al.*, 1991). L'importance de cette voie a pu être vérifiée lors de la réalisation d'une étude de transfert conduite en présence de sol et en enceinte fermée.

4.1.1.5. Conclusions

Un transfert de phénanthrène vers les racines et les parties aériennes du maïs a été mis en évidence au cours de deux expériences conduites en conditions hydroponiques. L'expérience conduite avec du phénanthrène marqué au ^{14}C a permis de montrer que les phases de germination ont une signification importante au niveau du transfert total. Les plantules de maïs absorbent et transfèrent le phénanthrène au delà de ces phases juvéniles, dans une moindre mesure cependant. De plus, il existe un effet de dilution dans la biomasse produite au cours du temps.

Le transfert par l'absorption racinaire a été mis en évidence au cours de notre expérience conduite avec du phénanthrène deutéré. Cette expérience a, de plus, souligné l'importance potentielle de la voie de contamination atmosphérique et donc l'importance des témoins dans nos expériences, ou de l'utilisation de traceurs pour discriminer les produits mis en œuvre lors de l'expérience de ceux dus à la contamination par l'air ambiant.

Le phénanthrène est une molécule représentative des HAP de faible poids moléculaire. Ces molécules sont susceptibles d'être transférées car leurs propriétés physico-chimiques (solubilité, Kow, volume moléculaire) n'excluent pas à priori leur passage à travers les barrières végétales, comme cela a été évoqué dans la partie bibliographique. Par contre, les molécules de haut poids moléculaire ont, semble-t-il, une faible probabilité d'être transférées car leur taille et leur lipophilicité réduit considérablement leur mobilité, en particulier dans les phases aqueuses. Aussi, le transfert des HAP de plus haut poids moléculaire a, dans un second temps, été examiné. Le benzo[a]pyrène a été utilisé parce qu'il s'agit du composé communément choisi comme traceur des HAP cancérigènes.

4.1.2. Transfert de benzo[a]pyrène

L'expérience décrite a été conduite avec du benzo[a]pyrène marqué au ^{14}C dans les mêmes conditions expérimentales que pour le phénanthrène. Le bilan de radioactivité retrouvée dans les différents compartiments du système aux différentes dates est présenté dans le tableau 13.

Tableau 13 : Répartition de la radioactivité retrouvée* dans les différents compartiments du système au cours de la croissance des plantules de maïs en présence de benzo[a]pyrène marqué au ^{14}C . Résultats exprimés en % de la radioactivité introduite.

Solution nutritive	10 jours		20 jours	
	Rinçage	Extractible	Rinçage	Extractible
Solution nutritive	5,3 ± 1,4 b		9,7 ± 2,4 a	
Feuilles	0,0 b	0,005 ± 0,004	0,1 ± 0,03 a	0,05 ± 0,03
Racines	0,4 ± 0,2 b	0,2 ± 0,1	2,4 ± 2,0 b	1,2 ± 0,9
Graines	1,0 ± 0,06 b	0,6 ± 0,2	1,4 ± 0,8 b	2,0 ± 0,3
Dissipation	84,6 ± 1,1 a		75,9 ± 1,3 a	
Total	92,2 ± 3,6 a		91,9 ± 3,9 a	
Non retrouvée	7,8 ± 3,6 a		8,1 ± 3,9 b	

* Comptage direct des solutions nutritives, rinçage et extraction des parties végétales, dissipation évaluée grâce aux dispositif témoin; lettres : analyses de variance conduites indépendamment sur les valeurs de la solution nutritive, du total retrouvé, du total non retrouvé, de la dissipation et de l'ensemble des parties végétales en considérant la somme du rinçage et de l'extraction, n=4 et p=0,05.

La quantité de radioactivité présente dans la solution nutritive diminue très fortement pendant les 10 premiers jours, très peu ensuite. La quantité de radioactivité présente au niveau des parois en verre a été contrôlée. Elle est négligeable. Le benzo[a]pyrène n'est pas volatil mais est facilement exclu de la phase aqueuse car sa solubilité est très faible. La perte enregistrée pourrait donc être due à l'action combinée de la recristallisation du composé lorsque le volume de la solution diminue au cours du temps, et de l'entraînement par l'eau.

Les quantités de radioactivité présentes dans les tiges, racines et graines progressent au cours du temps. Après 20 jours, les teneurs en équivalent benzo[a]pyrène sont en moyenne de 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS dans les parties aériennes, 150,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS dans les racines et 3,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS dans les graines. Le transfert de benzo[a]pyrène vers les parties aériennes est donc apparemment plus faible que celui observé pour le phénanthrène. En ce sens, ces résultats confirment les observations faites par d'autres auteurs sur l'importance décroissante du transfert quand le poids moléculaire de la molécule augmente (Blum & Swarbrick, 1977; Edwards *et al.*, 1982; Edwards, 1986). Les valeurs obtenues sont aussi en accord avec celles généralement retrouvées dans la bibliographie soit entre 0,1 et 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Edwards, 1983).

Les racines constituent le principal compartiment où s'accumulent les produits radioactifs. Ces résultats confirment que les constituants racinaires ont une très forte affinité pour les

molécules très lipophiles, ce que l'étude de la nature des barrières végétales nous avait suggéré. Les racines pourraient donc constituer un réservoir pour le transfert, très lent de molécules vers les parties aériennes. De même que pour le phénanthrène, plus de 50% de la radioactivité retrouvée est récupérée par rinçage, ce qui traduirait l'existence d'une fraction ayant faiblement pénétré dans la racine.

Au niveau des tiges, la quantité de radioactivité retrouvée par rinçage augmente au cours du temps. Malgré la très faible volatilité de la molécule, il est tout de même possible qu'un transfert à partir de la phase gazeuse ait eu lieu.

De même que pour le phénanthrène, nous avons comparé les teneurs expérimentales en benzo[a]pyrène des parties végétales à celles calculées selon le modèle mathématique de transfert de Briggs *et al.* (1982) qui prédit le transfert racinaire et aérien de molécules organiques à partir des propriétés physico-chimiques de la molécule. La valeur calculée du Root Concentration Factor, facteur de concentration dans les racines est de 2182. Le RCF expérimental s'élève à 82. Le Stem Concentration Factor, facteur de concentration dans les feuilles, calculé est de 1,54. La valeur expérimentale du SCF est de 1,72. Le SCF calculé est donc bien prédit par la théorie de Briggs, ce qui confirme que la lipophilicité de la molécule est un facteur clé du transfert des HAP de fort poids moléculaire. Le RCF est par contre très sous évalué, ce qui, comme dans le cas du phénanthrène montre 1) les limites d'un raisonnement simplifié à partir des propriétés physico-chimiques et 2) qu'une très forte disponibilité du HAP ne s'accompagne pas forcément d'un transfert. Les valeurs trouvées ainsi que celles du modèle de Briggs sont également largement supérieures aux valeurs de bioconcentration couramment admises, soit des facteurs de concentrations compris entre 0,002 et 0,33 pour le benzo[a]pyrène (Edwards, 1983).

4.1.3. Conclusions

Il a été montré, à partir des résultats présentés, un transfert de benzo[a]pyrène, molécule choisie comme modèle des HAP de haut poids moléculaire. Toutefois, l'intensité du transfert est réduite par rapport à une molécule de plus faible poids moléculaire comme le phénanthrène.

L'utilisation de systèmes hydroponiques permet d'obtenir une biodisponibilité maximale du HAP pour la plante. Cette biodisponibilité s'accompagne, pour le phénanthrène comme pour le benzo[a]pyrène d'une surestimation du transfert par rapport aux données bibliographiques.

Cette surestimation découle de l'emploi de solution hydroponiques dans lesquelles la biodisponibilité des produits est totale. La présence de matières organiques dans le sol, dont

l'affinité pour les molécules organiques est forte, limiterait potentiellement leur quantité dans les phases gazeuse et liquide, c'est à dire la quantité biodisponible. Cette diminution de la biodisponibilité devrait donc logiquement se traduire par une diminution de la quantité transférée aux plantes, à moins bien sûr que celles-ci puissent influencer sur cette biodisponibilité. L'influence du sol sur l'intensité du transfert du phénanthrène et du benzo[a]pyrène a donc été examinée dans la seconde partie de cette étude.

Par ailleurs, notre expérience de transfert avec du phénanthrène deutéré avait permis de mettre en évidence une contamination des végétaux à partir de l'atmosphère. Ces résultats nous suggéraient l'importance de la voie de transfert atmosphérique. Nous avons donc, à l'occasion de la mise en place d'un dispositif expérimental fermé, étudié la capacité des parties aériennes à capter des HAP et leurs molécules dérivées à partir de l'atmosphère.

4.2. Influence des propriétés d'adsorption du sol sur le transfert de HAP vers les parties aériennes du maïs

4.2.1. Etude du transfert de phénanthrène en vases de végétation

4.2.1.1. Répartition des produits radioactifs dans les compartiments végétaux

A l'issue de la culture du maïs en présence de terre agricole (1,82% MO) ou de terre d'ancienne usine à gaz G1 (7,5% MO), amendées avec du phénanthrène marqué au ^{14}C , un bilan de la radioactivité présente dans les diverses fractions végétales et dans l'extrait à l'eau des terres est présenté dans le tableau 14.

En présence de terre agricole comme de terre d'ancienne usine à gaz, aucune radioactivité n'est détectée dans les tigelles, quelle que soit la date de prélèvement. Or, à 14 jours, à quantité égale de phénanthrène marqué apportée dans la solution hydroponique, une quantité non négligeable de radioactivité avait été détectée dans les parties aériennes des plantules de maïs. Ces résultats sont confortés par les travaux d'Edwards *et al.* (1982), sur le soja et l'anthracène, molécule proche du phénanthrène. Cette limitation est vraisemblablement la conséquence de la très forte affinité des HAP pour les matières organiques du sol. Cette capacité de rétention limite la quantité de HAP présent en phase aqueuse et en phase gazeuse dans le sol, au profit de la phase solide.

Tableau 14 : Radioactivité retrouvée dans les parties végétales et dans l'extrait à l'eau des terres après 3, 7 et 14 jours de culture de plantules de maïs sur une terre agricole et une terre d'AUG à laquelle a été apportée du phénanthrène marqué au ^{14}C . Résultats exprimés en ng équivalent phénanthrène g^{-1} MS pour les végétaux et en ng équivalent phénanthrène g^{-1} terre pour l'extrait à l'eau.

	3 jours	8 jours	14 jours
Terre agricole			
Terre extrait eau	0,07 ± 0,01 b	0,52 ± 0,02 a	0,69 ± 0,19 a
Tiges	n.d.	n.d.	n.d.
Parties racinaires	1,05 ± 3,16 b	0,03 ± 0,01 a	0,01 ± 0,003 b
Terre AUG			
Terre extrait eau	0,18 ± 0,12 a	0,10 ± 0,14 a	0,05 ± 0,08 a
Tiges	n.d.	n.d.	n.d.
Parties racinaires	68,00 ± 71,00 a	0,54 ± 0,54 a	2,46 ± 2,46 a

n.d. : non détecté; lettres : analyses de variance indépendantes par ligne, $n=3$ et $p=0,05$.

Pour la terre agricole, la quantité présente dans les racines à trois jours est significativement supérieure à celles obtenues aux deux autres dates. En présence de terre d'ancienne usine à gaz, la quantité de radioactivité présente au niveau des parties racinaires est relativement élevée à trois jours, faible ensuite. A dose égale de phénanthrène radioactif apportée et à la même date, ces quantités sont beaucoup plus faibles que celles trouvées dans les parties racinaires des plantules de maïs cultivées en milieu hydroponique. Ceci conforte donc les observations faites précédemment quant à la biodisponibilité du HAP pour le maïs.

En solution hydroponique 100% du phénanthrène est en phase liquide donc biodisponible. En présence de terre, la fraction biodisponible du HAP est celle présente dans la solution du sol. On peut l'approcher grâce à une extraction à l'eau. Nous avons donc caractérisé la fraction biodisponible du phénanthrène marqué dans la terre agricole et la terre d'ancienne usine à gaz au cours du temps.

4.2.1.2. Fraction de phénanthrène biodisponible

La quantité de phénanthrène marqué biodisponible augmente significativement au cours du temps pour la terre agricole (tableau 14). Elle est ainsi multipliée par 10 entre 3 et 14 jours. Pour la terre d'ancienne usine à gaz, la quantité biodisponible diminue au cours du temps : elle passe ainsi de 0,18 ng phénanthrène g^{-1} terre à 3 jours à 0,05 ng phénanthrène g^{-1} terre à 14 jours.

La diminution de la fraction extractible à l'eau pour la terre d'ancienne usine à gaz pourrait traduire une diminution de la biodisponibilité du produit. Cette diminution pourrait être due à la forte rétention du produit par les constituants de la terre et à l'absorption par les racines. Quelle que soit la date de prélèvement et d'analyse, la fraction extractible à l'eau de la terre agricole est supérieure à celle de la terre d'ancienne usine à gaz. Cette observation confirme ainsi l'hypothèse de la limitation de la biodisponibilité par les constituants organiques du sol. En effet, la terre d'ancienne usine à gaz contient 4 fois plus de matières organiques que la terre agricole.

La terre agricole présente un comportement différent de la terre d'ancienne usine à gaz puisque la fraction biodisponible augmente au cours du temps. Cette augmentation est apparemment en désaccord avec l'hypothèse faite. Ce phénomène pourrait traduire la formation de métabolites de HAP, qui sont plus polaires, donc moins retenus par le sol. La quantité de radioactivité présente dans l'extrait n'a pas permis d'identifier par CLHP les molécules présentes dans cette fraction. Les éventuels métabolites formés, résultant en général d'une simple oxydation de la molécule sans cassure des noyaux aromatiques, sont plus susceptibles que les molécules mères d'être transférées car leurs propriétés les rendent plus mobiles. Une fois transférés ces métabolites peuvent être incorporés dans les tissus végétaux (Sandermann *et al.*, 1983). Or, si une augmentation de la quantité de radioactivité présente dans les racines est bien observée, aucun passage ultérieur n'est détecté dans les parties aériennes. Ce résultat indique, que si il y a eu formation de métabolites dans le sol, ceux-ci n'ont pas été transférés vers les plantules de maïs. Cependant, ce résultat n'exclut pas totalement l'hypothèse de la présence de métabolites dans la fraction biodisponible.

Après avoir étudié l'évolution de la fraction biodisponible de radioactivité dans les deux terres, nous avons recherché une corrélation entre la radioactivité présente dans les racines et celle présente dans la fraction extraite à l'eau.

Pour la terre agricole, il existe une très bonne corrélation entre la fraction extraite à l'eau et celle extractible au niveau des racines à 14 jours ($r^2=0,999$). Ce résultat pourrait traduire un équilibre de concentration entre les racines et la solution du sol. Avant cette date, ces deux variables ne sont pas corrélées. Pour la terre d'ancienne usine à gaz, la corrélation est relativement bonne à 3 jours ($r^2=0,828$) et diminue ensuite, vraisemblablement à la suite de la fixation du phénanthrène sur les constituants organiques du sol.

4.2.1.3. Conclusions

Cette expérience a permis de montrer qu'en présence de sol, le transfert de HAP était limité par la biodisponibilité du produit. Cependant, cette expérience a été conduite en milieu ouvert. Nous n'avons ainsi pas accès aux paramètres de dissipation du produit, ni à ceux de la dégradation. Par ailleurs, l'absence de radioactivité dans les feuilles des plantules de maïs montre l'absence d'effet de la volatilisation éventuelle de composés marqués sur la contamination des parties aériennes. Or l'étude bibliographique montre que cette voie de transfert pourrait ne pas être négligeable. Afin de conforter ces résultats et d'étudier l'influence du sol sur la contamination par voie gazeuse des plantes, nous avons donc mis en place une culture de plantules de maïs en présence de terre traitée par du phénanthrène et du benzo[a]pyrène marqués, dans des enceintes fermées. Nous avons utilisé deux molécules modèles représentatives des HAP légers et lourds, afin de mettre en évidence les spécificités de comportement des différentes molécules. Le phénanthrène utilisé pour cette expérience était marqué sur tous les carbones de manière à optimiser le suivi de la molécule dans le système. Ce qui n'a malheureusement pas pu être obtenu pour le benzo[a]pyrène, qui n'est donc marqué que sur 2 carbones.

4.2.2. Etude du transfert du phénanthrène et du benzo[a]pyrène en vases de végétation placés dans une enceinte fermée

Des plantules de maïs ont été cultivées pendant 16 jours sur de la terre agricole présentant des teneurs en phénanthrène ou benzo[a]pyrène de 152 ng g⁻¹ terre ou 467 ng g⁻¹ terre respectivement, en enceintes fermées. Les tableaux 15 et 16 résument les teneurs en équivalent phénanthrène et benzo[a]pyrène marqué des plantules témoin et des plantules test après 16 jours de culture.

4.2.2.1. Phénanthrène

Des produits radioactifs sont détectés dans les divers compartiments des plantes ayant poussé sur une terre enrichie en phénanthrène marqué. Les plus fortes teneurs sont retrouvées dans les racines et dans les graines.

La teneur des feuilles est vingt-cinq fois plus faible que celle des racines. Les teneurs en phénanthrène obtenues dans cette expérience sont environ mille fois plus faibles que celles enregistrées à 14 jours en milieu hydroponique et du même ordre de grandeur que celle obtenues en présence de sol dans l'expérience précédente. Ces résultats confirment donc que le transfert de HAP dans les plantes est limité en présence de sol.

Tableau 15 : Teneurs en produits radioactifs des différents compartiments des plantes ayant poussé en présence de phénanthrène marqué au ^{14}C ou non (témoin) pendant 16 jours. Résultats exprimés en ng équivalent phénanthrène g^{-1} MS.

		Feuilles	Racines	Graines
Terre non contaminée	R	$0,9 \pm 0,8$	$1,0 \pm 1,3$	$0,05 \pm 0,05$
	E	$21,1 \pm 10,9$	$1,1 \pm 1,1$	$0,4 \pm 0,3$
	NE	-	-	-
Terre contaminée	R	$0,5 \pm 0,4$	$34,2 \pm 26,4$	$7,5 \pm 3,9$
	E	$1,0 \pm 0,3$	$39,2 \pm 10,3$	$29,9 \pm 9,6$
	NE	$1,1 \pm 0,1$	$19,1 \pm 5,1$	$26,0 \pm 9,7$

R : rinçage, E : extractible à l'acétonitrile, NE : résidus non extractibles retrouvés par combustion.

La fraction de produit retrouvée par rinçage est assimilée à la fraction faiblement retenue, adsorbée dans des zones facilement accessibles des organes végétaux. La fraction extractible au solvant représente la fraction ayant migré vers l'intérieur des organes végétaux. La fraction retrouvée après combustion correspondrait aux résidus liés c'est à dire au produit incorporé à la biomasse végétale. Au niveau des feuilles, $1/5^{\text{ème}}$ de la radioactivité est retrouvée par rinçage. Les quantités retrouvées par extraction et combustion sont équivalentes. Au niveau des racines, 35% du produit est facilement retrouvé, 40% est extrait au solvant et 25% est présent sous forme non extractible. Au niveau des graines, ces quantités sont respectivement de 12, 47 et 41%.

Les parties aériennes des plantules témoin présentent une teneur en phénanthrène dix fois supérieure à celle des plantules ayant poussé sur les vases de végétation contenant la terre contaminée. Cette valeur élevée est en fait due au très faible développement aérien des plantules témoin. Considérant les quantités de produits concernées, les plantules témoins présentent $1/4$ de la radioactivité des plantules test. Ce résultat montre donc sans ambiguïté la contamination des plantules par l'atmosphère.

Au cours de l'expérience, un dégagement de $2,1 \mu\text{g}$ équivalent phénanthrène de dioxyde de carbone marqué et de $0,03 \mu\text{g}$ équivalent phénanthrène de molécules organiques volatiles marquées a été mesuré. Les produits marqués dégagés ne sont cependant pas identifiés. Ils pourraient correspondre à la dégradation des impuretés du produit puisque les $2,1 \mu\text{g}$ dégagés correspondent environ à 2% du produit introduit soit la proportion d'impuretés de celui-ci.

Les parties aériennes de la plante ont donc capté ces produits radioactifs. Elles ont pu fixer les molécules organiques volatiles (phénanthrène et/ou métabolites) passivement par piégeage

dans les cires. Elles ont pu aussi fixer le carbone 14 du CO₂ par la photosynthèse. La présence de radioactivité au niveau des graines des plantes témoin peut s'expliquer par la condensation d'eau contenant des produits marqués à leur surface. La contamination des racines en découlerait. On ne peut toutefois pas exclure que des molécules captées par les feuilles aient été transférée jusqu'aux racines. En particulier, la fixation de molécules de dioxyde de carbone par la photosynthèse a pu donner lieu à la formation d'assimilats ensuite exsudés au niveau des racines.

Les facteurs de bioconcentration dans les feuilles et les racines, en tenant compte des teneurs présentes dans les plantules témoin, sont de 0,016 et 0,608 respectivement.

4.2.2.2. Benzo[a]pyrène

En présence de benzo[a]pyrène, il y a 5 fois plus de produit transféré dans les racines que dans les feuilles, ce qui confirme la très forte affinité des constituants racinaires pour les molécules très lipophiles. Les facteurs de bioconcentration dans les parties aériennes et racinaires sont de 0,05 et 0,23. Le facteur de bioconcentration aérien est en accord avec les valeurs couramment retrouvées dans la bibliographie pour des substrats terreux (Edwards, 1983).

Bien que les quantités de produit apportées aient été quarante fois plus faibles en milieu hydroponique, les teneurs en benzo[a]pyrène des plantes sont inférieures en présence de terre : d'un facteur cent pour les feuilles, mille pour les racines et les graines. Ce qui confirme encore la limitation du transfert par le sol du fait d'une moins grande disponibilité des produits pour le transfert.

Tableau 16 : Teneurs des différents compartiments des plantes ayant poussé en présence de benzo[a]pyrène marqué au ¹⁴C ou non (témoin) pendant 16 jours. Résultats exprimés en ng équivalent benzo[a]pyrène g⁻¹ MS.

		Feuilles	Racines	Graines
Terre non contaminée	R	0,003 ± 0,004	0,009 ± 0,01	0,007 ± 0,009
	E	1,1 ± 0,6	0,002 ± 0,00	0,02 ± 0,01
	NE	-	-	-
Terre contaminée	R	2,0 ± 1,9	49,7 ± 24,3	15,4 ± 10,9
	E	15,5 ± 1,1	45,8 ± 29,6	11,6 ± 4,8
	NE	6,8 ± 2,5	11,9 ± 11,8	11,0 ± 1,5

R : rinçage, E : extractible à l'acétonitrile, NE : résidus non extractibles retrouvés par combustion.

La contamination des plantules témoin est négligeable, ce qui est corrélé à la quasi absence de dégagement de molécules volatiles et de CO₂ marqués mesurées. La voie de contamination gazeuse n'est donc significative que pour les HAP de faible poids moléculaire. Nos travaux sur le phénanthrène et le benzo[a]pyrène marqués au ¹⁴C permettent ainsi d'étayer les observations de Larsson & Sahlberg (1981).

4.2.2.3. Conclusions

Les résultats obtenus apportent deux renseignements importants. Tout d'abord, ils confirment les hypothèses formulées au paragraphe 4.1. sur la limitation du transfert en présence de sol et les résultats de l'expérience conduite en vases de végétation. L'intensité du transfert est conforme à ce qui est couramment retrouvé dans la littérature.

Ces résultats montrent ensuite que les plantules interceptent des produits dérivés des HAP, dioxyde de carbone ou molécules volatiles, par la voie atmosphérique. Cette voie de transfert représente 1/4 du transfert total dans le cas du phénanthrène, et n'est pas active dans le cas du benzo[a]pyrène, molécule qui est très peu volatile et n'est pas dégradée dans la durée de l'expérience.

5. Conclusions

L'utilisation de systèmes hydroponiques a permis de mettre en évidence un transfert solution-plantules de maïs de phénanthrène et de benzo[a]pyrène. Les quantités de HAP accumulées sont supérieures dans les racines par rapport aux feuilles, pour le benzo[a]pyrène en particulier. Les facteurs de bioconcentration sont faibles mais toutefois surestimés par rapport aux valeurs couramment admises. L'intensité du transfert est inversement proportionnelle au poids moléculaire de la molécule.

Dans un second temps, en présence de sol et à quantité égale de HAP apportée, nous avons montré que le transfert sol-racine puis sol-racine-feuilles diminuait fortement. Les facteurs de bioconcentration sont alors conformes à ceux de la littérature. Ces expériences traduisent la diminution de la biodisponibilité des HAP en présence des constituants du sol. Toutefois, même en conditions de totale disponibilité (solution), le transfert intéresse une faible quantité du produit total. Le transfert de HAP n'est donc pas un phénomène très significatif.

Un transfert du phénanthrène a été mis en évidence sur des plantules dès la germination mais aussi, dans une moindre mesure toutefois, lors de phases ultérieures de développement. Les phases de germination sont cependant des périodes clés pour expliquer l'intensité totale du transfert. La vitesse d'accumulation des HAP diminue fortement ensuite.

L'existence d'une double voie de transfert, racinaire et par l'atmosphère a été mise en évidence. La voie gazeuse n'est pas significative pour des molécules lourdes et peu volatiles comme le benzo[a]pyrène. Par contre, cette voie explique 20% de la contamination des plantules dans le cas du phénanthrène, molécule volatile. Une caractérisation des produits transférés et de leur devenir dans les végétaux serait cependant nécessaire afin d'évaluer les problèmes posés par l'existence du transfert.

Au vu des résultats obtenus, l'extraction et l'accumulation par les plantes des HAP du sol, ou **phytoextraction**, n'est pas une composante majeure à envisager lors de la mise en place d'un phytotraitement. Par ailleurs, l'existence d'un transfert de HAP en quantités réduites ne remet pas en question, à ce stade de l'étude, l'intérêt de l'utilisation des plantes pour traiter les sol contaminés par des HAP.

Ainsi, après avoir étudié l'impact de la contamination sur le développement des espèces, puis avoir mis en évidence un très faible transfert de HAP, l'effet de la présence de plantes sur le devenir des HAP du sol a été étudié.

Chapitre 3 : Dissipation des HAP présents dans différents sols- Approche modélisée en conditions contrôlées et naturelles

1. INTRODUCTION

Des études récentes, conduites en particulier sur les HAP, mais aussi, de nombreux autres composés organiques suggèrent que la présence de végétation pourrait accélérer la décontamination de sols pollués par des composés organiques (Aprill & Sims, 1990; Lee & Banks, 1993; Chaîneau, 1995; Reilley *et al.*, 1996; Pradhan *et al.*, 1998; Banks *et al.*, 1999; Liste & Alexander, 2000b). Il existe en effet une microflore capable de dégrader les HAP dans les terres contaminées et non contaminées (Kästner *et al.*, 1994; Chaîneau, 1995). Cette microflore adaptée à la dégradation des HAP, ainsi que la microflore non adaptée, trouvent au niveau de la rhizosphère un habitat favorable à leur développement, notamment grâce à l'exsudation racinaire (Hiltner, 1904; Rovira, 1969; Morel, 1985). L'exsudation représente entre 10 et 20% du carbone fixé par la plante. Elle favorise le développement d'une microflore hétérotrophe. Cette microflore est de plus potentiellement capable d'utiliser ces exsudats comme source d'énergie et de dégrader les HAP par cométabolisme (Bouchez *et al.*, 1995).

L'objectif de ce chapitre est ainsi d'étudier le devenir des HAP dans et hors la rhizosphère de plantes cultivées. L'étude du phénomène a été abordée à différentes échelles, de taille croissante, successivement discutées dans ce chapitre : le vase de végétation, le dispositif pilote de lysimètres et le site contaminé. Si le système central de l'étude a été en permanence la terre d'ancienne usine à gaz, l'utilisation de terre agricole contaminée à l'aide de molécules pures, marquées ou non, a permis de simplifier le système afin d'en préciser le comportement.

2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. Devenir des polluants organiques dans le sol

Dans le sol, les polluants se répartissent entre phase solide, phase liquide et phase gazeuse (figure 37). La répartition dépend des propriétés physico-chimiques des molécules et du milieu dans lequel elles se trouvent. Cette répartition n'est pas stable au cours du temps. Elle est susceptible d'évoluer en fonction des conditions physico-chimiques, de la transformation chimique des polluants et des interactions sol-polluant (Barriuso *et al.*, 1996).

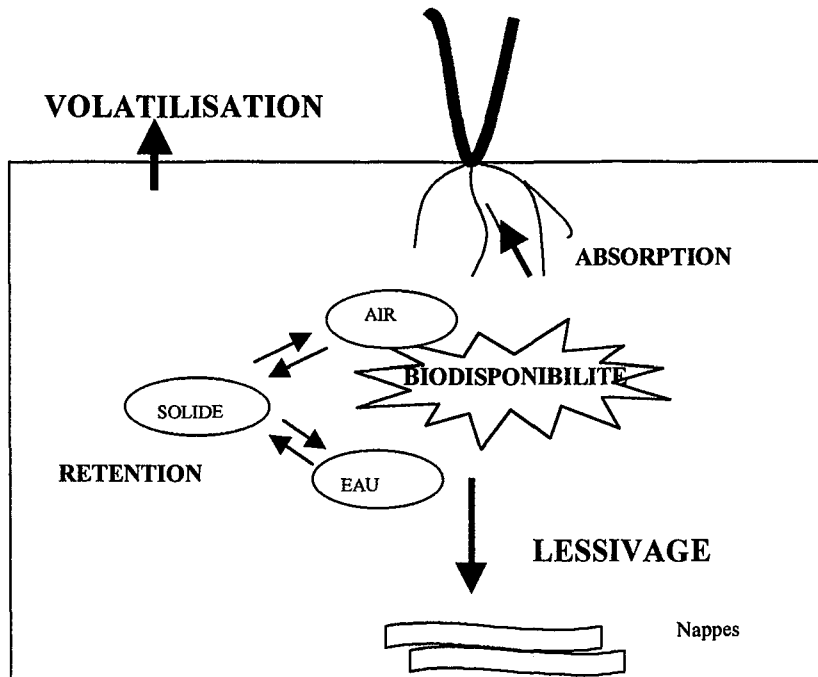


Figure 37 : Devenir des HAP dans le sol (d'après Barriuso *et al.*, 1996)

Les HAP sont des molécules peu hydrosolubles, semi-volatiles et lipophiles. Elles se trouvent principalement dans la phase solide du sol avec laquelle elles interagissent fortement. Cette interaction se traduit par leur persistance et leur rétention dans le sol. Cette forte rétention par les composés solides du sol diminue les risques de dispersion des HAP mais rend plus difficile leur élimination (Barriuso *et al.*, 1996).

La persistance d'un polluant dans le sol est le temps pendant lequel celui-ci y est présent. Elle dépend des phénomènes qui assurent la diminution de sa concentration. Ces processus concernent la transformation, la rétention et le transport. La transformation résulte la plupart du temps d'un métabolisme, d'une photolyse ou d'une hydrolyse, qui conduisent à la formation de nombreux composés dérivés. Le transport concerne quant à lui la mobilité du polluant dans le système et résulte d'un lessivage, d'un ruissellement vers les eaux de surface ou de la volatilisation (Barriuso *et al.*, 1996).

La rétention est gouvernée par des processus physico-chimiques qui régissent les équilibres entre les divers compartiments du système : absorption par les végétaux ou la microflore, cinétiques d'adsorption-désorption sur les constituants du sol, De manière générale, et dans le cas des HAP plus particulièrement, les processus de rétention pilotent les autres processus. En effet, ils gouvernent la quantité de polluant présente en phase vapeur et liquide,

c'est à dire la fraction disponible, en particulier pour être dégradée par les micro-organismes ou quitter le système par lessivage.

2.2. Rétention des polluants organiques dans le sol : conséquences sur la disponibilité et la biodisponibilité

2.2.1. Différentes formes d'un polluant dans les sols

Dans le sol, les molécules xénobiotiques interagissent avec les différents constituants du sol. Ces interactions présentent diverses conséquences sur la disponibilité des polluants. La figure 38 résume les différentes formes, physiques et chimiques d'un polluant organique dans les sols.

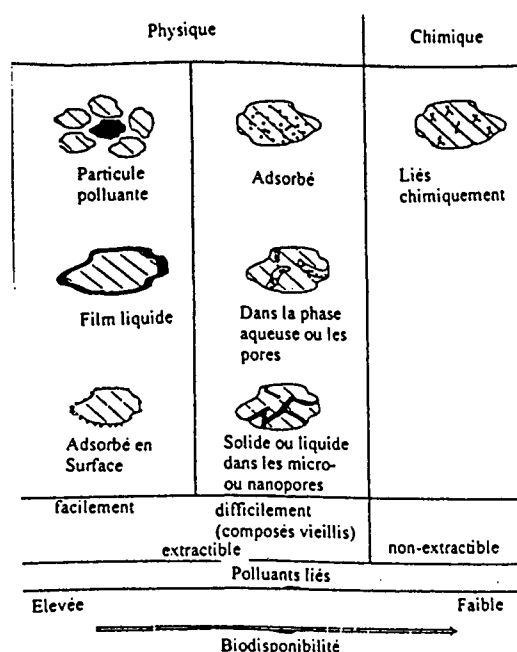


Figure 38 : Différentes formes prises par un polluant organique dans un sol (d'après Verstraete & Devliegher, 1996).

La fraction disponible d'un polluant est celle facilement extractible (<1 h de contact avec le solvant). Elle se compose des polluants présents sous forme particulaire, sous forme de film ou sous forme adsorbée à la surface des particules de sol (Verstraete & Devliegher, 1996).

La fraction peu disponible est la fraction accessible par des traitements drastiques. Elle comporte les polluants qui ont migré vers des sites moins accessibles au sein des constituants du sol. Le passage du polluant d'une forme très disponible vers une forme peu disponible détermine le "vieillissement" du polluant au contact du sol.

Le polluant peut enfin être présent sous forme non-extractible. Sa nature chimique est alors modifiée. La molécule est incorporée aux constituants du sol par polymérisation ou formation de liaisons covalentes avec les composés humiques (Verstraete & Devliegher, 1996; Kubicki & Apitz, 1999; Nanny, 1999).

2.2.2. Fraction du polluant adsorbée aux constituants du sol

L'adsorption d'un polluant est la fixation non covalente de ce polluant à la surface ou à l'intérieur des constituants du sol (Verstraete & Devliegher, 1996). Le type de liaison mis en jeu appartient au domaine des interactions faibles : liaisons par transfert de charge, liaisons hydrophobes, liaisons de Van der Waals ou attractions électrostatiques .

Le phénomène d'adsorption résulte d'une partition rapide et réversible du polluant entre la phase liquide et la phase solide du sol. Ce phénomène dépend fortement des propriétés et de la concentration de la molécule dans la phase liquide. Il peut être décrit par exemple par le modèle de Freundlich. La cinétique d'adsorption présente deux phases. La première phase est rapide et correspond à l'adsorption de surface. La deuxième phase est plus lente et correspond à la migration du polluant vers des sites moins accessibles, plus tortueux (Chung & Alexander, 1998; Kohl & Rice, 1999).

Dans le cas des HAP, molécules lipophiles et peu solubles dans l'eau, la matière organique est la fraction majeure du sol responsable de la rétention. L'adsorption augmente ainsi avec la fraction de carbone organique (f_{oc}) (Onken & Traina, 1997).

Dans certains cas particuliers, le HAP peut être piégé de manière irréversible dans un environnement hydrophobe de la matière organique. Seule une modification de l'assemblage tridimensionnel des molécules humiques est alors à même de le relarguer (Eschenbach *et al.*, 1998). Parmi les différentes macromolécules organiques du sol, celles dont le caractère aromatique est le plus marqué présentent la meilleure capacité de rétention des HAP. Les molécules les plus aromatiques traduisent un degré d'humification plus important. Ainsi, plus le degré d'humification augmente, plus l'adsorption est grande (Benoît *et al.*, 1999).

Les molécules humiques se répartissent entre acides fulviques, acides humiques et humine. Ces trois types de molécules traduisent un degré croissant d'aromatisation et d'humification. La majorité des résidus liés se trouve au niveau des fractions lipidiques de l'humine (Kohl & Rice, 1998, 1999). Les acides humiques retiennent plus les HAP que les acides fulviques, bien que la capacité de sorption des acides fulviques vis à vis de molécules apolaires, ne formant pas de liaisons hydrogène, soit non négligeable. La présence d'acides fulviques diminuerait en

effet la polarité du solvant matriciel. Celui-ci se comporterait alors comme un solvant organique (Nanny, 1999).

La capacité de rétention est surtout influencée par la présence d'espaces libres hydrophobes dans les structures des macromolécules organiques. La lignine est de ce point de vue un meilleur piège que les acides humiques, bien que ce soit un polymère relativement polaire, moins cependant que les acides humiques, au niveau desquels on trouve de nombreuses fonctions hydroxyle, amine ou acide (Kubicki & Aplitz, 1999).

L'adsorption des HAP aux constituants du sol est un phénomène théoriquement réversible. Cependant, ces molécules étant peu solubles et très fortement adsorbées, la désorption est un phénomène extrêmement lent. Ainsi, la fraction du polluant adsorbée, bien que relativement disponible, ne peut être considérée comme réellement biodisponible que sur un pas de temps suffisant long.

La faible vitesse de désorption présente par conséquent 2 inconvénients majeurs dans le cadre d'un bio-traitement. Les micro-organismes dégradant principalement le polluant dissous, la désorption est ainsi une étape limitante de la biodégradation (Bouchez *et al.*, 1995; Hatzinger & Alexander, 1997; Uraizee *et al.*, 1998). D'autre part, le temps nécessaire au traitement de cette fraction peut être long.

2.2.3. Fraction du polluant incorporée aux constituants du sol

La liaison chimique d'un polluant organique aux constituants du sol procède par la formation de liaisons covalentes. Les types de liaisons les plus fréquentes sont : les liaisons ester, les liaisons éther et les liaisons carbone-carbone.

Ces liaisons se forment entre le polluant et la matière humique du sol, grâce à un couplage oxydatif. Les couplages oxydatifs nécessaires à l'incorporation des HAP et de leurs métabolites dans les matières humiques sont catalysés soit par des enzymes microbiennes (Bollag, 1992), soit par des composés inorganiques ou des minéraux argileux (Karimi-Lotfabad *et al.*, 1996; Verstraete & Devliegher, 1996).

Parmi les familles d'enzymes impliquées dans les couplages oxydatifs, on trouve les peroxydases et les phénol-oxydases. Les peroxydases sont relarguées dans le sol par certaines plantes mais aussi et surtout par les champignons filamenteux. Les phénol-oxydases sont des enzymes produites par des champignons, notamment ceux de la pourriture blanche. Parmi les phénol-oxydases, les laccases, présentes chez certains champignons filamenteux ont un comportement particulier.

Les HAP sont des molécules stables, peu réactives, au contraire de leurs métabolites. Ces métabolites, les phénols et les quinones en particulier, sont ainsi plus susceptibles de subir le phénomène de liaison chimique (Gibson & Subramanian, 1984; Commandeur & Parson, 1990; Richnow *et al.*, 1994, 1995, 1997).

Une fraction non négligeable des métabolites des HAP peut ainsi être retrouvée dans les matières organiques. Richnow *et al.* (1994) ont par exemple montré que 42% de l'acide hydroxy-naphthoïque (métabolite de l'anthracène identifié par Cerniglia & Heitkamp, 1989) et 46% de l'acide phénanthrène-4-carboxylique (métabolite du pyrène) produits suite à la biodégradation des HAP apportés lors de leur expérience ont été incorporés dans les molécules humiques. D'autres auteurs, à l'exemple de Ressler *et al.* (1999), ont évalué la quantité de carbone piégée dans les matières organiques lors d'une expérience de dissipation des HAP, à 20% environ du carbone total apporté sous forme de HAP.

Les HAP modifiés puis incorporés peuvent être retrouvés sous forme de matière organique dissoute ou particulaire, de structure analogue aux acides humiques. La formation de résidus liés pourrait donc être un processus majeur de la transformation et/ou immobilisation des polluants hydrophobes (Bollag & Loll, 1983; Schnöder *et al.*, 1993; Kästner *et al.*, 1995; Michaelis *et al.*, 1995) et de leur persistance dans les sols (Lichtfouse *et al.*, 1997).

Les fractions liées chimiquement constituent la fraction réfractaire aux traitements des sols (Erickson *et al.*, 1993). L'existence de cette fraction résiduelle est souvent un problème lors de la mise en œuvre des processus de traitement. En effet, les risques d'exposition des organismes vivants à cette fraction du polluant ne sont pas clairement caractérisés, puisque l'on ignore par exemple leur capacité à repasser vers un état plus biodisponible, sous l'effet de certaines conditions. Certains auteurs comme Eschenbach *et al.* (1998) ont en effet montré une absence de remobilisation du produit, même après des traitements physiques ou chimiques agressifs. Cependant, et au vu d'autres travaux, il semble que des traitements ayant pour conséquence une déstructuration des matières organiques s'accompagnent d'une remobilisation des polluants incorporés. Cette remobilisation augmenterait alors d'autant le risque d'exposition global des organismes vivants aux polluants.

De manière naturelle, si aucun traitement visant à les remobiliser n'est mis en place, les HAP et métabolites piégés semblent entrer dans le cycle global des matières humiques (Richnow *et al.*, 1995). Ils se comportent alors comme les acides humiques et acides fulviques au niveau desquels ils sont piégés et sont progressivement minéralisés au rythme de 1 à 2% par an.

2.3. Transport des polluants organiques vers les eaux de surface ou les eaux souterraines

Plus un produit est retenu par le sol, moins il présente de risques de polluer les eaux. Cependant, plus un produit est persistant dans le sol, plus il aura de chances d'être transféré vers une nappe ou les eaux de surface en cas de modification de son environnement chimique. La persistance et la rétention peuvent être évaluées respectivement par la demi-vie du polluant dans le sol et le coefficient d'adsorption aux substances organiques K_{oc} . Ces deux paramètres présentent des valeurs élevées dans le cas des HAP. Les HAP ne présentent donc potentiellement pas de risque élevé de pollution des nappes par entraînement en profondeur (Barriuso *et al.*, 1996). Cependant, certaines conditions particulières peuvent s'accompagner de la présence dans la phase aqueuse de quantités non négligeables de HAP.

Les matières organiques dissoutes ou en suspension ainsi que les colloïdes présentent une forte affinité pour les molécules hydrophobes comme les HAP (McCarthy & Jimenez, 1985; Maxin & Kögel-Knabner, 1995). L'adsorption des HAP à ces substances est instantanée (Maxin & Kögel-Knabner, 1995) et réversible (McCarthy & Jimenez, 1985).

La liaison aux matières particulaires dissoutes diminue la biodisponibilité des HAP, car l'adsorption est forte, (McCarthy & Jimenez, 1985) mais augmente leur solubilité apparente. Ainsi Maxin & Kögel-Knabner (1995) ont pu montrer qu'à concentration de HAP égale, en présence de 50 mg l⁻¹ de carbone sous forme de matière organique dissoute, la concentration aqueuse apparente était multipliée par deux.

Le transport de HAP dans le sol peut ainsi de cette manière augmenter malgré la très faible solubilité des produits (Marschner *et al.*, 1999). Cependant, la désorption des HAP des particules vers la phase aqueuse présente les mêmes limites que pour le sol. Cette quantité de HAP qui est mobile n'est donc pas forcément biodisponible.

De plus, dans le cas de sols agrégés (sols sur site), la percolation d'eau se fait au niveau de la macroporosité. Seule une partie du sol (et des polluants) est ainsi accessible à l'eau. La fraction du polluant pouvant être potentiellement solubilisée est donc limitée. Dans le cas des sols d'ancienne usine à gaz, la présence de goudrons colmate les pores et contribue à limiter la surface de contact entre le sol et les HAP (Vercamer *et al.*, 1996).

Les pratiques et processus qui peuvent conduire à la formation de ces matières organiques dissoutes sont : le chaulage, qui décondense les molécules humiques, l'épandage de matières organiques, l'exsudation, ainsi qu'une augmentation de la température. Si aucun apport de matière organique n'est réalisé dans ces sols, la concentration de matière organique dissoute

(MOD) est faible. Le transport de HAP par cette voie sera par conséquent négligeable. Si un apport de matière organique ou un chaulage est effectué ou si une hausse de température est enregistrée, des quantités importantes de MOD (et de polluants liés) sont relarguées et peuvent migrer dans le profil. De même, toute opération tendant à augmenter la porosité du sol présente le risque d'augmenter parallèlement la mobilité des polluants (Vercamer *et al.*, 1996). Dans le cas des terres d'ancienne usine à gaz, les phases de manipulation des terres lors des processus de réhabilitation seront critiques de ce point de vue.

2.4. Biodégradation des HAP dans le sol

Une microflore capable de dégrader les hydrocarbures est présente dans les sols sans historique d'apport de HAP (Kästner *et al.*, 1994; Chaîneau, 1995), ainsi que dans les sols contaminés (Bidaud & Tran-Minh, 1998). Cependant, cette microflore, dont les capacités dégradatives sont le plus souvent présentes à l'état latent, peut être induite rapidement lors de l'introduction de HAP dans le milieu (Aamand *et al.*, 1989; Kästner *et al.*, 1998; Griffiths *et al.*, 1999; Hayes *et al.*, 1999). Son abondance relative augmente alors fortement au départ puis diminue progressivement au cours de la biodégradation (Chaîneau, 1995). Cette diminution peut découler d'une quantité de nutriments qui devient limitante, d'une diminution de la biodégradabilité de la fraction résiduelle, ou de l'inhibition de l'activité dégradante par les produits de dégradation des HAP.

2.4.1. Biodégradabilité des HAP

La biodégradabilité des HAP est fonction de leur nombre de cycles (Wild & Jones, 1992; Oudot, 1994). Les coefficients de biodégradabilité des divers HAP ont pu être mesurés au cours du suivi sur une période d'au moins un an, d'un sédiment placé en conditions optimisées et en aérobiose. Les HAP di- et tri-aromatiques sont relativement dégradables (45-60%), les tétra-aromatiques sont résistants (30-45%) et les HAP de plus fort poids moléculaire très résistants (0-30%). Ces valeurs peuvent varier fortement pour une même molécule, selon sa biodisponibilité. Ainsi lors d'une expérience de remédiation d'un sol de friche industrielle contaminé par des HAP, le taux de dégradation du phénanthrène a été de 8% *in-situ* et de 87% lorsque la terre a été excavée et traitée selon le principe du terre biologique (Allard & Neilson, 1997). Les HAP de très haut poids moléculaire, plus ou moins dégradables, sont le plus souvent dégradés par cométabolisme, un substrat plus facilement dégradable étant utilisé comme source d'énergie (Bouchez *et al.*, 1995). La dégradation est alors en général incomplète et s'accompagne de l'accumulation de métabolites (Cerniglia & Heitkamp, 1989;

Bouchez *et al.*, 1995). L'induction du co-métabolisme dépend cependant de l'existence dans le sol de substrats carbonés adéquats, des HAP de plus faible poids moléculaire et de plus grande mobilité par exemple. En effet, la présence de substrats encore plus dégradables a la plupart du temps comme conséquence d'interférer avec la biodégradation des polluants réfractaires, car ils sont préférentiellement utilisés (Deschênes *et al.*, 1996). Les produits de dégradation peuvent par ailleurs aussi inhiber l'activité dégradante (Bouchez *et al.*, 1995).

2.4.2. Biodégradation des HAP par les micro-organismes du sol

De nombreuses bactéries du sol, en particulier le genre *Pseudomonas* et le genre *Mycobacterium*, dégradent les HAP du sol (Cerniglia & Heitkamp, 1989; Smith, 1990; Fredrickson *et al.*, 1991; Grifoll *et al.*, 1992; Grund *et al.*, 1992; Caldini *et al.*, 1995; Chaîneau *et al.*, 1995; Durant *et al.*, 1995; Mineki *et al.*, 1996).

Les champignons non lignolytiques et surtout les champignons lignolytiques comme *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* ou *Trametes versicolor* sont efficaces pour dégrader les HAP (Sack & Günther, 1993; Barclay *et al.*, 1995; Bezalel *et al.*, 1996a,b ; Casillas *et al.*, 1996; Collins & Dobson, 1996; Cerniglia, 1997; Wolter *et al.*, 1997; Novotny *et al.*, 1999). La figure 39 résume les voies de dégradation aérobie des bactéries (organismes procaryotes) et champignons (organismes eucaryotes).

Les bactéries dégradent les HAP via la formation de cis-dihydrodiols. La réaction est catalysée par une dioxygénase qui incorpore 2 atomes d'oxygène dans la molécule. Certaines bactéries présentent cependant aussi une activité mono-oxygénase. Une hydrolase catalyse ensuite la formation de catéchols ou d'acide protocatéchique, suivant les cas. La méta fission du noyau par des dioxygénases conduit à des composés qui éventuellement finissent dans le cycle de Krebs, qui sont utilisés par d'autres organismes, ou s'accumulent dans les cellules (Grifoll *et al.*, 1992; Cenci & Caldini, 1997). Les enzymes bactériennes mises en jeu sont intracellulaires.

Les champignons et les systèmes eucaryotiques en général dégradent les HAP en formant des époxydes très réactifs puis des trans-dihydrodiols. La chaîne de dégradation ne s'accompagne pas en général de la fission des noyaux aromatiques. La minéralisation est négligeable et les produits de dégradation s'accumulent et/ou sont fixés au niveau des constituants du sol (Allard & Neilson, 1997). Plusieurs types d'enzymes interviennent au début de la chaîne métabolique, toutes conduisant à l'oxydation des molécules mère. Les enzymes les plus fréquentes sont les cytochromes P-450, mono-oxygénases intra-cellulaires.

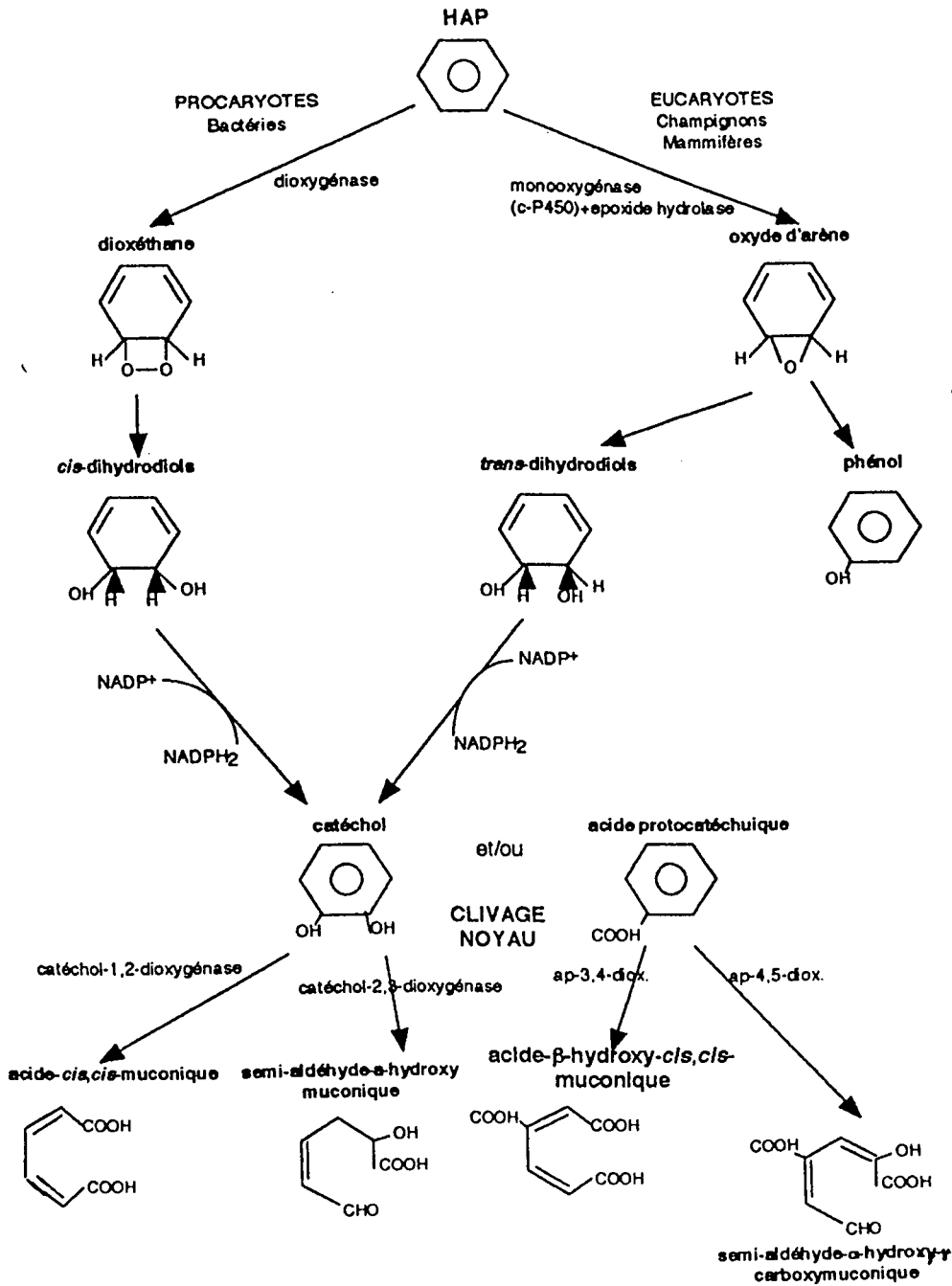


Figure 39 : Principales voies de dégradation biologique des HAP

Les basidiomycètes et les champignons lignolytiques, les champignons de la pourriture blanche (White Rot Fungi) en particulier, possèdent de nombreuses enzymes intervenant dans l'oxydation des HAP sans être spécifiques. Ces enzymes sont de plus extracellulaires, ce qui fait que leur activité au niveau du sol est indépendante de la capacité des champignons qui les

produisent à absorber et donc supporter des concentrations en polluants éventuellement toxiques. Les lignine-peroxydases, présentes chez la majorité des champignons, interviennent au niveau de l'oxygénation et de la dépolymérisation de la lignine (Field *et al.*, 1993) et sont induites au niveau du métabolisme secondaire en conditions nutritives limitantes (Cerniglia, 1997). Les HAP de potentiel d'ionisation inférieur ou égal à 7,55 eV sont des substrats directs pour l'oxydation par la lignine-peroxydase (Barclay *et al.*, 1995). Pour les HAP de potentiel d'ionisation supérieur, comme le phénanthrène (8,19 eV), l'attaque est réalisée par des radicaux libres. Ces radicaux sont produits lors de la peroxydation des lipides par des peroxydases manganèse-dépendantes ou par action des laccases (Collins & Dobson, 1996; Collins *et al.*, 1996; Bogan & Lamar, 1996; Bogan *et al.*, 1996 a, b et c; Johannes *et al.*, 1996). Les Mn-peroxydases oxydent le Mn de l'état II vers l'état III. Ces espèces diffusent facilement à l'intérieur des polymères pour initier l'oxydation et sont donc à ce titre plus efficaces que les laccases (Field *et al.*, 1993). Les produits formés sont en particulier des quinones.

La biodégradation des HAP découle de l'existence de structures génétiques localisées en particulier au niveau de plasmides. Le plasmide TOL est responsable de la dégradation des xylènes et du toluène. Le plasmide NAH est responsable de la capacité à dégrader le naphthalène et le phénanthrène. Ces plasmides ont été identifiés chez les bactéries du genre *Pseudomonas* (Menn *et al.*, 1993). D'autres gènes, intervenant au niveau des voies de clivage (méta ou ortho) des noyaux aromatiques sont présents au niveau des chromosomes (Van der Meer *et al.*, 1992).

2.4.3. Facteurs influençant la biodégradation des HAP

Un certain nombre de facteurs jouent sur l'intensité des phénomènes de biodégradation. Ces facteurs sont liés 1) à la microflore, 2) au sol et 3) à l'environnement.

Les facteurs liés à l'adaptation de la microflore et à l'effet du sol sur la biodisponibilité ont été discutés précédemment. Les facteurs liés au sol et à l'environnement sont des paramètres physiques qui gouvernent le développement de la microflore et les conditions physico-chimiques nécessaires au fonctionnement des réactions enzymatiques et chimiques. Il s'agit en particulier :

- de la température : Elle influe d'une part sur la volatilisation des fractions volatiles toxiques mais aussi sur le développement microbien et l'activité enzymatique. La température optimum pour le développement de la microflore ou les réactions

chimiques et/ou enzymatiques se situe généralement entre 28°C et 37°C (Atlas, 1991).

- du pH : Un pH proche de la neutralité est favorable à l'ensemble des phénomènes. A pH acide, les champignons sont favorisés par rapport aux bactéries.
- des conditions redox, du taux d'oxygène et de la présence de nutriments : Les principales enzymes de la chaîne métabolique des HAP sont des oxygénases. Le taux d'oxygène est donc un facteur limitant de la biodégradation. L'apport de nutriments (N, P et K) est souvent indispensable car les sols d'ancienne usine à gaz et les produits pétroliers en contiennent très peu.
- la teneur en eau : Elle doit être comprise entre 50 et 80% de la capacité au champ.

2.5. Effet rhizosphère et conséquences potentielles sur la biodégradation des HAP

2.5.1. Description de l'effet rhizosphère

La rhizosphère se définit comme la zone du sol sous influence des racines. Dans le sol, le nombre moyen de microorganismes varie de 10^6 à 10^{10} cellules g^{-1} pour les bactéries, 10^8 à 10^9 pour les actinomycètes et 10^6 pour les champignons. Au voisinage des racines, ce nombre augmente considérablement. Par exemple, pour le blé de printemps, le rapport du nombre de microorganismes dans le sol rhizosphérique à celui du sol non rhizosphérique est de l'ordre de 23 en moyenne pour les bactéries, mais cette valeur peut atteindre 100 dans certains cas (Anderson *et al.*, 1993). Ce phénomène, observé en 1904 par Hiltner, est appelé "effet rhizosphère".

2.5.2. Exsudation

L'effet rhizosphère est en relation avec l'exsudation de la plante. Ce phénomène se compose de l'exsudation *stricto sensu* et de la rhizodéposition. La rhizodéposition est le relargage de composés par les cellules épidermiques : mucilages et lysats de cellules. L'exsudation est une sécrétion de la racine, qui a lieu au niveau de la zone d'élongation (Rovira, 1973). Les exsudats représentent jusqu'à 20% du carbone fixé par la photosynthèse. Ils se composent de sucres, acides organiques, acides aminés et protéines, acides nucléiques et vitamines, ainsi que d'hormones végétales. La qualité et la quantité d'exsudat varie selon l'espèce, les conditions environnementales ou l'état physiologique de la plante (Rovira, 1959, 1969). La plante modifie son exsudation en réponse à des facteurs de stress. Par exemple, le trèfle

diminue son exsudation de sérine, d'acide glutamique et d'alanine en situation de faible éclaircissement (Rovira, 1959).

2.5.3. Conséquences de la présence de plantes sur les paramètres physico-chimiques du sol

La rhizosphère des plantes est un lieu favorable au développement de la microflore car la plante agit, notamment par l'exsudation, sur certains facteurs clé de son développement : la fertilité du sol, la structure, l'aération en particulier.

Les plantes stimulent l'état de fertilité du sol. La présence d'exsudats sélectionne une microflore capable d'utiliser ces substrats très disponibles et très dégradables. Parmi ces molécules, les sucres et les acides organiques en particulier, sont de bons candidats pour l'induction dans la rhizosphère des co-métabolismes nécessaires à la dégradation des HAP de haut poids moléculaire. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'une augmentation de l'activité de la microflore suite à l'apport de substrats facilement utilisables. Cette augmentation de l'activité microbienne peut se traduire par une augmentation parallèle de la dégradation de macromolécules humiques, pourtant peu dégradables (phénomène de "priming action", Jenkinson, 1966).

Les plantes fournissent également des formes utilisables d'azote au sol et aux micro-organismes. C'est par exemple le cas des légumineuses nodulantes fixatrices d'azote comme le trèfle ou le lupin (Rovira, 1969). Cet apport de composés azotés participe ainsi à l'augmentation de l'état de fertilité azotée des sols. Cet aspect pourrait donc se révéler particulièrement intéressant lorsque l'on considère des sols très déséquilibrés du point de vue nutritionnel comme les sols d'ancienne usine à gaz

De plus, les plantes dicotylédones et monocotylédones possèdent des stratégies pour acquérir certains ions minéraux indispensables comme le fer. Par exemple, les graminées exsudent des acides non protéiques (molécules dont la structure est proche de celle des acides aminés mais dont les voies de synthèse sont différentes de celles des protéines), les phytosidérophores, dont les propriétés de complexation permettent de récupérer le fer dissous. Cette action des plantes sur la disponibilité des éléments minéraux montre que la plante peut tirer partie de milieux potentiellement défavorables à sa croissance.

Les exsudats favorisent aussi de manière indirecte l'amélioration de la structure du sol (ameublissement et porosité) par la rhizodéposition. Les mucilages, composés de haut poids moléculaire relargués par les racines, jouent en effet le rôle de ciment organique au niveau des agrégats (Habib *et al.*, 1990 a et b; Morel *et al.*, 1991). Ces mucilages ont une action à long

terme, tandis que les composés de plus faible poids moléculaire, de demi-vie plus faible, ont une action rapide mais limitée dans le temps.

La présence de racines favorise par ailleurs la diffusion des gaz dans le sol, dont le transfert d'oxygène. De plus, grâce à son action sur la structure du sol et au flux transpiratoire, la plante draine vers la rhizosphère de grandes quantités d'eau et de solutés (Clothier & Green, 1997). Un pied de maïs à maturité évapotranspire par exemple plus de 400 ml d'eau par jour. On peut ainsi comparer la plante à une pompe fonctionnant grâce à l'énergie solaire. Cette action présente deux conséquences majeures : elle contribue d'une part à maintenir des conditions d'humidité et un niveau de nutriments compatibles avec le développement optimal de la microflore et, d'autre part, elle peut ainsi drainer les polluants vers sa rhizosphère.

La plante intervient enfin dans les processus globaux d'évolution des molécules organiques du sol comme la minéralisation de l'azote ou l'humification des molécules organiques. En modifiant l'environnement chimique de la rhizosphère par le biais de l'exsudation, la plante pourrait dans certains cas contribuer à la décondensation des matières humiques et au relargage des polluants qui y sont piégés (Nardi *et al.*, 1997). Inversement, plante et microorganismes entrent parfois en compétition pour l'utilisation de l'azote par exemple (Bottner *et al.*, 1999). Certaines enzymes végétales comme les peroxydases soustraient les polluants de la biodégradation en favorisant leur incorporation dans les molécules humiques grâce aux processus de l'humification (Haider *et al.*, 1989) ou leur minéralisation.

2.6. "Phytoremédiation" de molécules organiques et des HAP

Plusieurs facteurs ont suscité l'intérêt de l'utilisation de plantes pour dépolluer les sols contaminés par des molécules organiques. Ces facteurs sont liés au fonctionnement de la plante. Ils concernent la capacité des végétaux à 1) stimuler la microflore dégradante, 2) stimuler la dissipation grâce à l'exsudation en particulier, 3) induire les co-métabolismes nécessaires à la dégradation des HAP de haut poids moléculaire et 4) agir sur la disponibilité des HAP.

La dissipation de molécules organiques en présence et absence de plantes a été étudiée pour diverses molécules organiques : les HAP (Aprill & Sims, 1990; Ferro *et al.*, 1994; Qiu *et al.*, 1994; Schwab & Banks, 1994; Chaîneau, 1995; Günther *et al.*, 1996; Reilley *et al.*, 1996; Banks *et al.*, 1999; Chaîneau *et al.*, 2000; Liste & Alexander, 2000b), mais aussi d'autres hydrocarbures, des solvants et des pesticides comme le 2,4-D (Ferro *et al.*, 1994; Boyle & Shann, 1995, 1998; Narayanan *et al.*, 1995; Günther *et al.*, 1996).

1) En présence de plantes, la dissipation de ces diverses molécules organiques apportées, pures dans un sol, augmente. Dans certaines études utilisant des traceurs, le parallèle existant entre les paramètres de dissipation et les paramètres microbiens suggère une augmentation de la biodégradation en présence de plantes (Boyle & Shann, 1995; Günther *et al.*, 1996). Ces résultats montrent ainsi que la plante pourrait effectivement stimuler, dans certains cas, la microflore dégradant les HAP.

2) Le sol planté peut être modélisé par un sol rhizosphérique, c'est à dire un sol sur lequel a eu lieu une culture de végétaux, végétaux dont les racines ont ensuite été intégralement séparées du sol, et sur lequel un apport de solutions d'acides organiques simples est réalisé pour simuler l'exsudation. Pour ce modèle, la dissipation des composés est supérieure par rapport à un sol non cultivé (Schwab & Banks, 1994; Boyle & Shann, 1995; Reilley *et al.*, 1996). Ces résultats montrent ainsi que les exsudats relargués par les racines sont un facteur clé de la dissipation des HAP. Le type d'exsudats relargués par la plante pourrait ainsi conditionner son efficacité. Parmi les espèces utilisées, en effet, les sols plantés, ou les sols rhizosphériques préalablement plantés, avec des graminées ont particulièrement stimulé la dissipation et/ou dégradation des molécules; mais certaines légumineuses se sont révélées dans certains cas plus efficaces (Aprill & Sims, 1990; Boyle & Shann, 1995; Reilley *et al.*, 1996).

3) L'utilisation de ce même sol modèle avec des molécules marquées a permis de montrer que la minéralisation de ces composés suivait une cinétique du 3^{ème} ordre (Schwab *et al.*, 1994). Cette succession de trois phases distinctes de minéralisation peut être l'indice de l'existence d'une suite de biodégradation, donc d'un co-métabolisme. L'exsudation de la plante pourrait donc bien éventuellement induire ces co-métabolismes.

4) Reilley *et al.* (1996) ont mis en évidence que des HAP peu biodisponibles étaient dissipés plus activement en présence de plantes, bien que cette dissipation soit très lente. Ce résultat tendrait donc à montrer que dans certains cas la plante pourrait agir, faiblement cependant, sur l'état de biodisponibilité des HAP, au bénéfice de la phytoremédiation.

Certaines données récentes tempèrent cependant les résultats positifs enregistrés pour la dissipation des HAP en présence de plante. Liste & Alexander (2000a) ont en effet mis en évidence une accumulation de HAP dans la rhizosphère, consécutive au drainage des polluants vers la rhizosphère sous l'effet du flux d'évapotranspiration. Cette arrivée massive de polluant excède leur vitesse de dissipation, d'où leur accumulation.

2.7. Conclusions

Il existe naturellement une microflore capable de dégrader les HAP au niveau du sol. Cette microflore est stimulée par un apport de HAP, son importance relative diminuant par la suite au fur et à mesure de la dégradation. Les HAP étant des molécules peu biodégradables, l'induction de co-métabolismes sera un facteur clé de la biodégradation. La plante, notamment par le biais de l'exsudation, crée au niveau de sa rhizosphère un habitat favorable aux microorganismes et à l'induction des co-métabolismes. Elle intervient aussi à différents niveaux sur le cycle du carbone dans le sol. Il a donc été émis comme hypothèse que la biodégradation des HAP dans le sol pourrait être accélérée à moindre coût en introduisant des plantes dans le milieu. Un certain nombre d'études sur divers produits organiques vont dans ce sens. Toutefois, ces études concernent la plupart du temps des produits qui ont été apportés purs dans un sol agricole. Nous sommes donc amenés à nous interroger sur l'existence de ce type d'observations quand il s'agit de polluants très peu ou pas biodisponibles. De plus, à l'exception d'Aprill & Sims (1990), aucune étude n'établit clairement le devenir des HAP (volatilisation, dégradation, séquestration).

En résumé, les connaissances actuelles sur les mécanismes qui influent sur la dissipation des HAP dans le sol sont quasi-inexistantes. De plus, l'étude de l'influence des plantes sur des pollutions anciennes telles que celle des sols d'AUG n'a pratiquement jamais été envisagée auparavant. Ceci justifie les travaux décrits dans ce mémoire.

L'objectif des expériences décrites dans ce chapitre est donc d'étudier le devenir des HAP des terres d'anciennes usines à gaz en présence ou absence de plantes dans différentes conditions. Parallèlement, des études ont été conduites avec des HAP purs et des terres agricoles. Ces études, utilisant un système plus simple que les terres d'anciennes usines à gaz, ont pour but d'essayer de préciser les mécanismes d'évolution des HAP dans le système sol-plante et de prendre en compte les différences de comportement dues à l'état de biodisponibilité de ces polluants dans le sol. Les dispositifs expérimentaux ont été choisis de manière à étudier des paramètres aussi différents que les conditions pédoclimatiques ou l'état du substrat.

3. MATERIELS ET METHODES

Les matériels et les méthodes présentés sont relatifs au devenir des HAP d'une terre dans le système sol-plante. Ces études ont été conduites, d'une part, à l'aide de dispositifs de laboratoire placés en conditions contrôlées et, d'autre part à l'aide d'un dispositif expérimental de la taille d'une micro-parcelle, utilisé comme pilote de traitement des terres en

présence de plantes et en conditions climatiques naturelles. Les résultats expérimentaux ont été confrontés aux résultats de l'analyse des teneurs en HAP des terres rhizosphériques et non rhizosphériques prélevées sur un site d'AUG resté à l'abandon pendant près de 30 ans.

3.1. Matériels

3.1.1. Les terres et leur conditionnement

Trois terres d'anciennes usines à gaz et une terre agricole ont été utilisées. La terre agricole, prélevée sur la commune de Chenevières, et les terres G1 et G2, prélevées sur le site d'ancienne usine à gaz G, ont été décrites dans le chapitre 1. La terre notée G3 a également été prélevée sur le site G. Les caractéristiques physico-chimiques de cette terre sont présentées dans le tableau 17.

Tableau 17 : Caractéristiques granulométriques et propriétés physico-chimiques de la terre G3.

	G3
Sables (g kg ⁻¹)	56,4
Limons (g kg ⁻¹)	23,1
Argiles (g kg ⁻¹)	20,5
Matières organiques (g kg ⁻¹)	8,8
Azote organique Kjeldahl (g kg ⁻¹)	1,54
C/N	33,2
pH eau	8,1
P ₂ O ₅ * (g kg ⁻¹)	0,062
K ₂ O échangeable** (g kg ⁻¹)	0,10
CaO échangeable** (g kg ⁻¹)	11,54
Na ₂ O échangeable** (g kg ⁻¹)	0,011
MgO échangeable** (g kg ⁻¹)	0,11
CEC*** (Cmol+ kg ⁻¹)	8,1
Capacité au champ (%)	21
16 HAP EPA (mg kg ⁻¹)	≈ 2500

*P₂O₅ méthode Joret-Hébert

** échangeable à l'acétate d'ammonium

*** CEC : Capacité d'Echange Cationique, méthode Metson

Dans les expériences conduites en conditions contrôlées et en dispositifs expérimentaux de volume réduit, la terre G1 et la terre de Chenevières ont été tamisées à 2 mm. La terre G3,

destinée à une expérience en colonnes de sol de grande taille, a été tamisée à 5 mm. L'augmentation de la taille des agrégats permet ainsi de limiter le tassement de la terre sous l'effet de la gravité.

3.1.2. Les espèces végétales

L'étude de la littérature montre que les espèces graminées prairiales favorisent la dissipation des HAP purs dans un sol agricole (Aprill et Sims, 1990). D'autre part, les légumineuses fixatrices d'azote et les espèces identifiées sur site sont des espèces rustiques intéressantes dans l'optique d'un phytotraitement. Les premières, car elles participent à l'état de fertilité du sol grâce à la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique et le relargage de composés azotés dans le sol. Les secondes, du fait de leur tolérance et de leur aptitude à s'installer et à croître sur des friches industrielles polluées par des HAP. Les espèces végétales utilisées sont listées dans le tableau 18.

Tableau 18 : Espèces végétales utilisées dans l'ensemble des expériences du chapitre 3.

Espèce	Nom latin	Famille botanique	Cultivar
Brome dressé	<i>Bromus erectus</i>	Graminées	-
Dactyle aggloméré	<i>Dactylis glomerata</i>	Graminées	Starly
Fétuque élevée	<i>Festuca eliator</i>	Graminées	Mylena
Luzerne	<i>Medicago sativa</i>	Papilionacées	Europe
Ray-grass	<i>Lolium perenne</i>	Graminées	Score
Trèfle violet	<i>Trifolium pratense</i>	Papilionacées	Marcon

Les espèces graminées prairiales ont été sélectionnées sur des critères de rusticité (pérennité, résistance) et de morphologie du système racinaire (profondeur maximale atteinte et densité du système racinaire (figures 40 à 43).

3.1.3. Produits

Le naphthalène, le phénanthrène, le fluoranthène, le chrysène et le benzo[a]pyrène, de puretés supérieures à 99% ont été fournis par Aldrich. Leurs propriétés physico-chimiques ont été citées lors de l'introduction générale. Le phénanthrène U-ring ^{14}C et le benzo[a]pyrène ^{14}C , marqué sur les carbones 7 et 10, ont été décrits dans le chapitre 2.

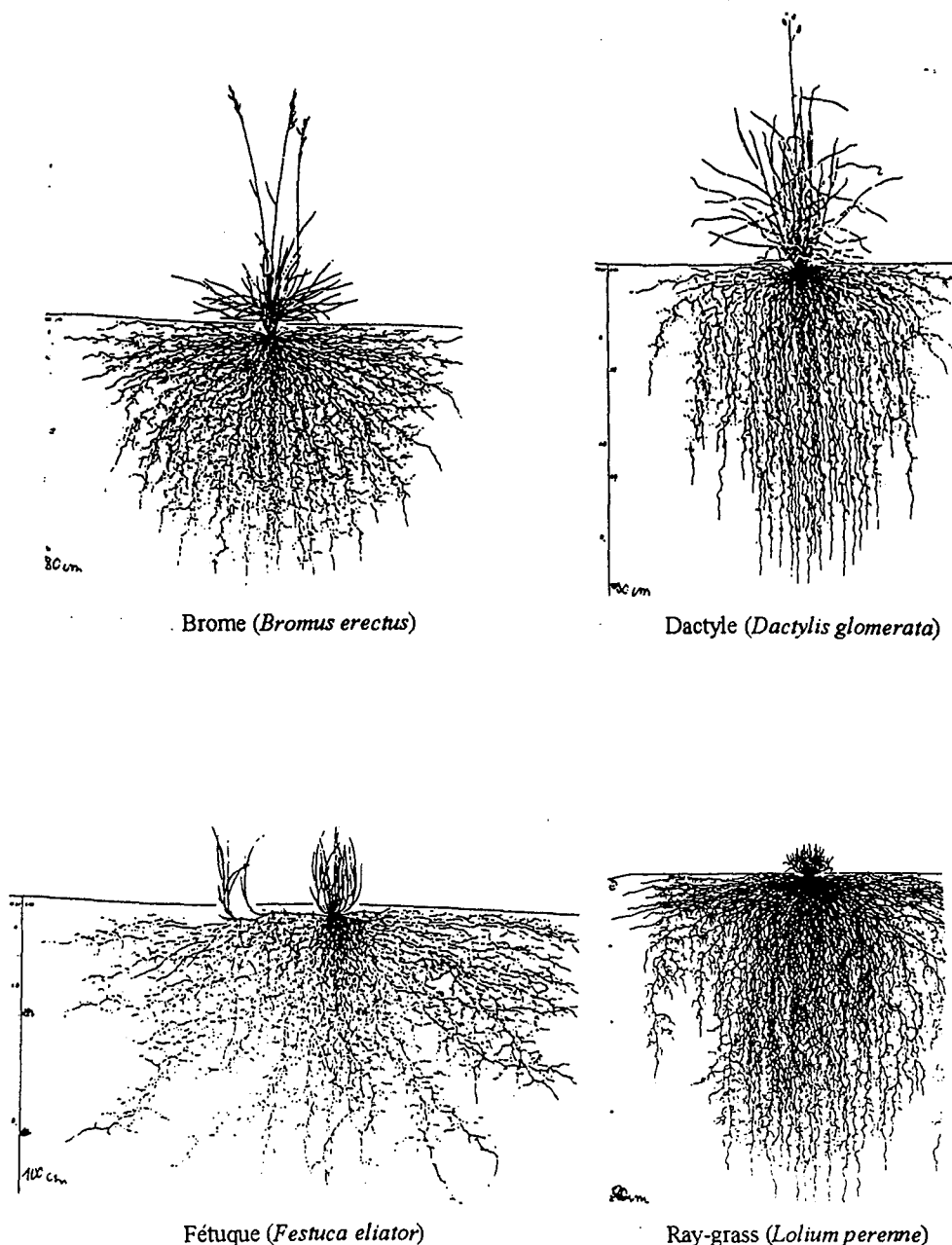


Figure 40 à 43 : Profils racinaires des espèces végétales utilisées.

3.2. Analyse des terres rhizosphériques et non rhizosphériques d'un site d'ancienne usine à gaz

3.2.1. Description des profils et caractérisation du matériau terreux

Sur chacune des 3 zones prospectées sur le site S, une fosse d'un mètre de profondeur a été creusée, afin de caractériser les horizons du profil, en particulier les horizons de surface colonisés par les racines des espèces végétales présentes. Ces fosses, réalisées dans les zones de concentration en HAP supérieure à 50, 500 et 5000 mg/kg, sont respectivement notées SP1, SP3 et SP2, par référence à des points de repères situés à proximité.

Les horizons sont numérotés dans l'ordre croissant de la surface vers la profondeur. Après description des profils et des matériaux, un échantillonnage a été effectué dans chacun des horizons des 3 fosses. Les matériaux prélevés ont été séchés puis tamisés à 2 mm. Trois échantillons de 30 g ont été constitués pour chaque horizon, à l'exception de l'horizon n°3 du profil SP3, presque exclusivement constitué d'un remblais serré de cailloux graniteux et pour lequel seul un échantillon a pu être constitué. Les HAP présents dans ces échantillons ont été analysés selon le protocole décrit dans le paragraphe 3.4. du chapitre 1. La description de ces fosses est présentée sur les figures 44 à 46.

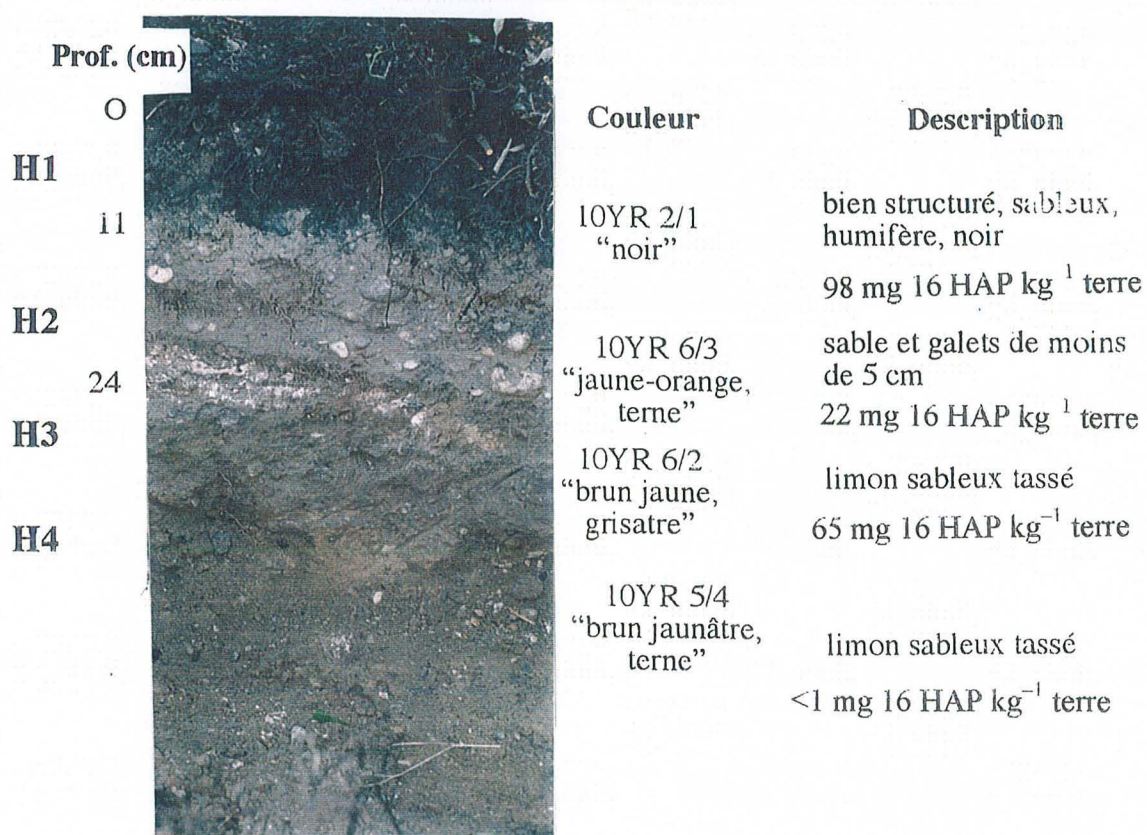


Figure 44 : Profil de sol SP1 réalisé dans la zone où la contamination moyenne en HAP des terres de surface est comprise entre 50 et 500 mg kg⁻¹.

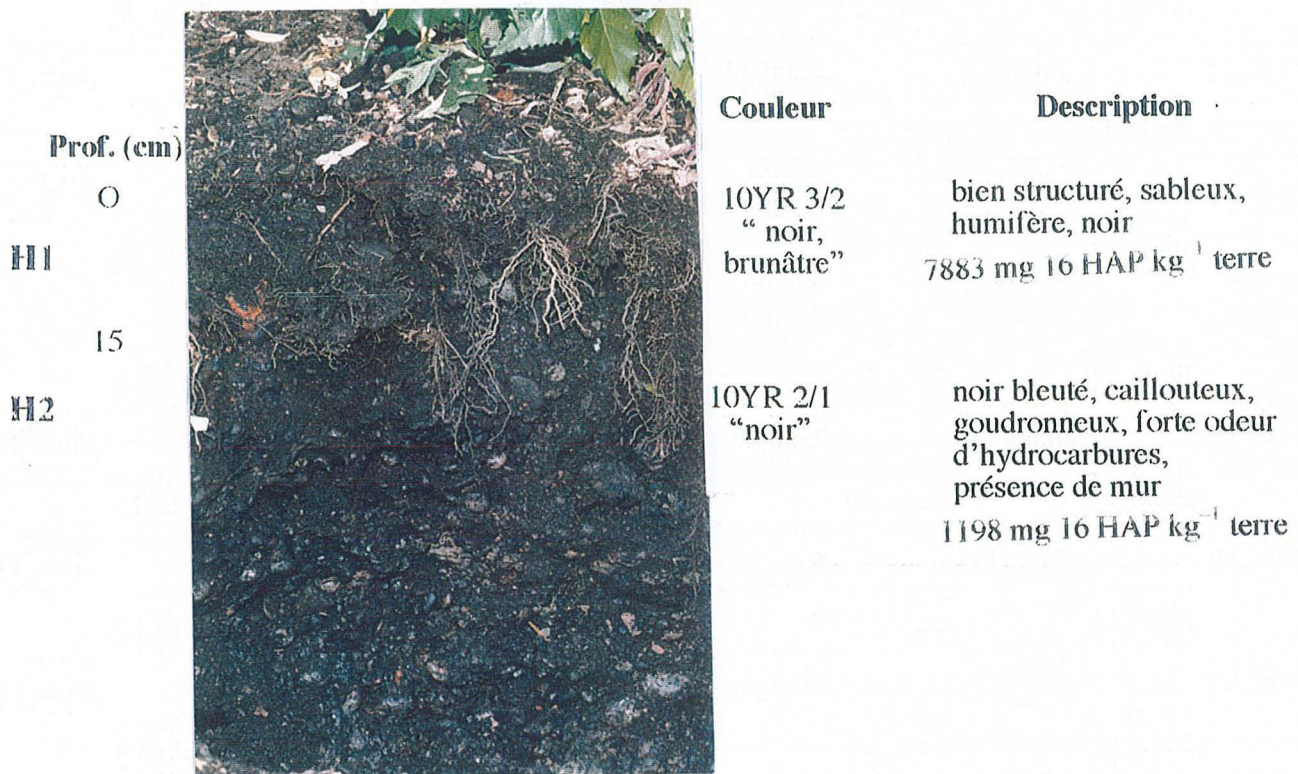


Figure 45 : Profil de sol SP2 réalisé dans la zone où la contamination moyenne en HAP des terres de surface est supérieure à 5000 mg kg⁻¹.

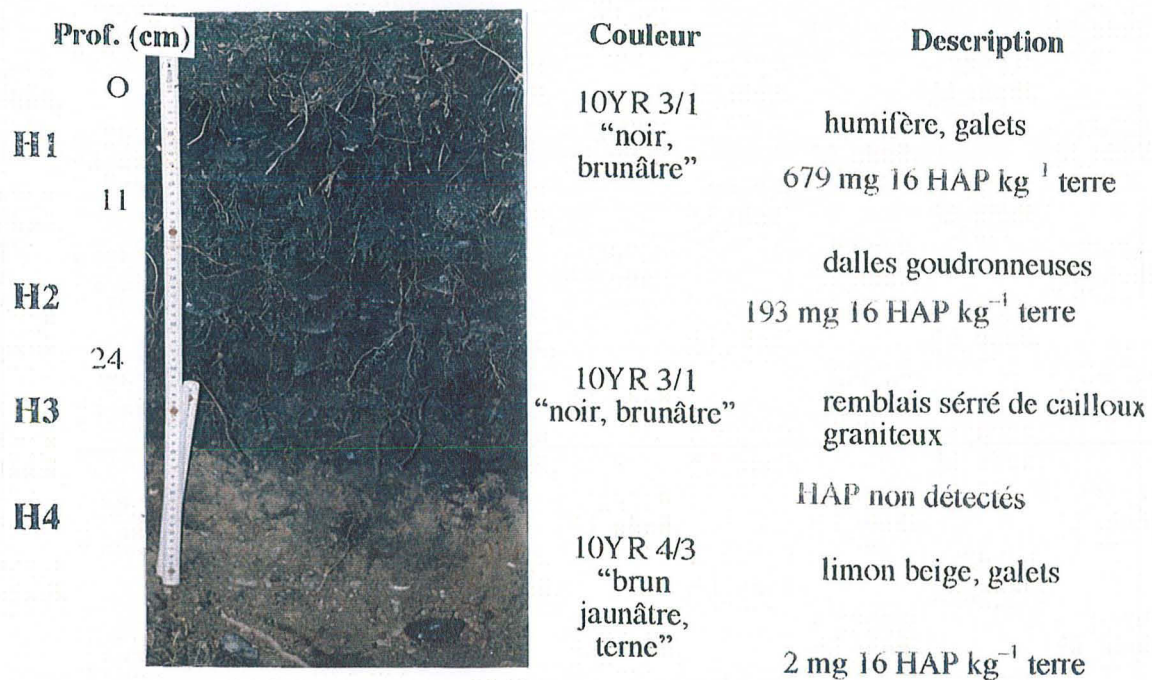


Figure 46 : Profil de sol SP3 réalisé dans la zone où la contamination moyenne en HAP des terres de surface est comprise entre 500 et 5000 mg kg⁻¹.

A l'arrêt des usines à gaz, la plupart des installations ont été démantelées. Les fondations des bâtiments ont été laissées en place, et les matériaux issus de la destruction ont été utilisés comme remblais. Les profils de sol actuels sur les sites d'anciennes usines à gaz reflètent ainsi cet historique. Ils sont caractérisés par des couches de matériaux variés (briques, murs, terres, scories, charbon, résidus goudronneux,...) disposés en couches plus ou moins compactes. La terre fine de l'ensemble des profils fait effervescence à l'HCl 5N, ce qui montre la présence de calcaire actif. La teneur en 16 HAP des horizons de surface des profils SP2, SP3 et SP1 sont respectivement de 1200, 680 et 98 mg kg⁻¹ terre.

3.2.2. Prélèvement et analyse de terre rhizosphérique et non rhizosphérique

Au niveau de chacun des horizons de surface, la masse racinaire présente a été prélevée. La terre non rhizosphérique a été récupérée en secouant les racines (terre non adhérente). La terre rhizosphérique est définie comme étant la terre adhérente aux racines. Elle a été récupérée en brossant ces racines avec un pinceau. Malgré la taille élevée du prélèvement effectué, seul un échantillon de terre rhizosphérique a pu être constitué, contre 3 échantillons de terre non rhizosphérique. Les différents échantillons prélevés ont ensuite été traités selon le protocole expérimental décrit dans le paragraphe 3.4. du chapitre 1.

3.3. Etude du devenir des HAP dans la rhizosphère de graminées en vases de végétation de volume réduit et en colonnes de sol

3.3.1. Expérience en vases de végétation

Le dispositif expérimental est constitué de vases de végétation en verre de 8 cm de diamètre et 4,5 cm de hauteur. Les vases sont remplis de 150 g de terre humidifiés à 80 % de la capacité au champ. Ils sont opacifiés avec du papier aluminium pour éviter la photodégradation latérale des HAP.

Chaque vase de végétation est identifié par les caractéristiques suivantes, correspondant aux définitions du plan expérimental :

- le type de terre utilisé : la terre agricole, la terre agricole contaminée par un mélange de 5 HAP ou la terre d'ancienne usine à gaz G1,
- le type de traitement appliqué : semis de ray-grass ou sol nu (témoin)
- le numéro de répétition : 5 pour chaque type de vase
- la date de prélèvement : 20, 60, 90, 135 et 170 jours, ces dates ayant été définies d'après les travaux de Richnow *et al.* (1995) et Bidaud & Tran-Minh (1998).

Cinq échantillons représentatifs sont réalisés pour chaque terre afin d'effectuer une caractérisation de la teneur en HAP de départ.

Le naphthalène, le phénanthrène, le fluoranthène, le chrysène et le benzo[a]pyrène sont apportés dans la terre agricole à la concentration de 50 mg kg⁻¹ chacun. L'apport de HAP est réalisé en solution de la même façon que celle décrite dans les chapitre 1 ou 2.

3.3.2. Expérience en colonnes de sol

Le dispositif est constitué de 25 colonnes de PVC de 16 cm de diamètre et 55 cm de hauteur. Chaque colonne, fermée à sa base, est remplie avec une couche de 4 cm de graviers, lavés à l'acide chlorhydrique puis rincés à l'eau distillée, et de 15 kg de terre d'ancienne usine à gaz G3, soit une couche de 50 cm. La terre est humidifiée à 80 % de sa capacité au champ par arrosage en surface. Cinq traitements sont mis en place, avec cinq répétitions. Trois modalités sont constituées de colonnes sur lesquelles est réalisé un semis de brome, de dactyle ou de fétuque. Une modalité est constituée de colonnes plantées avec le mélange des trois espèces et une modalité correspond aux colonnes témoin, sur lesquelles aucun semis n'est réalisé. Trois grammes de semences sont apportés sur chaque colonne plantée en une seule espèce et 1 g de semences de chacune des trois espèces sont apportés sur les colonnes plantées avec le mélange. Ces quantités ont été définies à partir de l'inhibition de germination constatée lors d'un test de germination préliminaire sur la terre d'ancienne usine à gaz utilisée, afin d'assurer une bonne densité de plantes sur les colonnes. Chaque colonne est ensuite placée dans une coupelle individuelle en plastique. La durée de la culture est de 180 jours.

3.3.3. Les conditions de culture

Les deux expériences ont été conduites en chambre de culture, dans les mêmes conditions. Les vases de végétation ou les colonnes y ont été placés selon un dispositif de blocs, afin de prendre en compte l'hétérogénéité des paramètres à l'intérieur de la chambre de culture. Les conditions sont les suivantes : 16 heures de photopériode à la température de 24°C, 8h de nyctipériode à la température de 18°C, et une humidité de l'air fixée à 75% de la saturation. L'éclairement est de 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$. Un arrosage journalier est réalisé par pesée pour maintenir constante l'humidité de la terre.

3.3.4. Les mesures

3.3.4.1. La biomasse produite

Pendant la durée des expériences, afin de caractériser les paramètres de croissance des espèces, la biomasse fraîche et sèche produite est mesurée.

Pour l'expérience en vases de végétation, la biomasse aérienne est mesurée à chaque date de prélèvement (20, 60, 90, 135 et 170 jours) sur tous les cristallisoirs.

Pour l'expérience en colonnes de sol, des coupes ont été réalisées après 45, 90, 120, 150 et 180 jours. Au bout de 180 jours, les colonnes sont découpées en 5 tranches : 0-10 cm (T1), 10-18 cm (T2), 18-26 cm (T3), 26-34 cm (T4), 34-42 cm (T5). La taille des tranches profondes tient compte de l'augmentation de densité due au tassement. Chaque tranche contient environ 3 kg de terre. Pour chaque tranche, les racines sont séparées de la terre, lavées puis séchées à l'étuve. La densité racinaire est évaluée par pesée de la matière sèche.

3.3.4.2. HAP extractibles au solvant

Les terres contenues dans les vases de végétation ou les colonnes de sol ont d'abord été séchées à l'air libre, puis les racines ont été séparées. Chaque vase de végétation contient 150 g de terre environ. L'analyse de la teneur en HAP a été conduite sur l'intégralité de l'échantillon de terre.

Pour les colonnes, chaque niveau contient environ 3 kg de terre tamisée à 5 mm. Ces échantillons ont donc, dans un premier temps, été tamisés à 2 mm. Puis, par réduction successive de la taille de l'échantillon, une aliquote de 30 g, représentative de l'échantillon de 3 kg, a été constituée. Cette aliquote a ensuite été analysée.

Le traitement des échantillons de terre a été conduit selon le protocole détaillé dans le paragraphe 3.4. du chapitre 1 de ce mémoire.

3.3.4.3. HAP non extractibles au solvant

L'analyse des HAP non extractibles consiste à détruire la structure de l'échantillon puis à extraire les HAP présents dans l'échantillon ainsi traité avant d'analyser la teneur en HAP de l'extrait.

Les échantillons de terre ont été placés dans des flacons avec 100 ml d'eau distillée et 10 ml d'héxamétaphosphate. Les flacons ont ensuite été agités pendant 1 heure à l'obscurité, puis ont été centrifugés à 5500 g pendant 20 min (Sigma 6-10, Bioblock Scientific). Une extraction liquide/liquide au dichlorométhane, dont le rapport solution aqueuse : dichlorométhane était de 4 : 1 (v : v), a été conduite sur le surnageant. Trois extractions successives pendant 10 min

sur un agitateur automatique d'ampoules à décanter ont été conduites. L'extrait a été récupéré, évaporé à sec sous vide dans un évaporateur rotatif. Il a ensuite été repris dans 100 ml d'acétonitrile puis a été analysé par CLHP-UV.

3.3.4.4. Caractérisation du pouvoir fixateur des terres de surface et de profondeur des colonnes plantées et non plantées

La capacité d'adsorption des HAP par les échantillons de terre est déterminée grâce à la réalisation d'isothermes d'adsorption du phénanthrène, dont le protocole est basé sur les recommandations de l'OECD (1996).

Les solutions de phénanthrène sont préparées dans une solution aqueuse de CaCl_2 0,01 M. Les 5 concentrations totales en phénanthrène employées sont : $10 \mu\text{g l}^{-1}$, $60 \mu\text{g l}^{-1}$, $110 \mu\text{g l}^{-1}$, $210 \mu\text{g l}^{-1}$ et $610 \mu\text{g l}^{-1}$. L'apport de phénanthrène marqué a été réalisé à hauteur de 250 Bq l^{-1} (soit environ $10 \mu\text{g l}^{-1}$) de manière identique pour les 5 solutions. Chaque échantillon est constitué d'un gramme de terre tamisé à 2 mm mis en suspension dans 10 ml de solution de phénanthrène, dont le rapport sol : solution est égal à 1 : 10 (p : v), dans un tube en inox. L'utilisation des tubes en inox permet de limiter au maximum les phénomènes d'adsorption du HAP aux parois. L'importance de l'adsorption au tube est évaluée grâce à la réalisation de témoins sans terre. Les tubes sont agités à l'aide d'un agitateur rotatif dans une pièce thermostatée à $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Une étude préliminaire a permis de déterminer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre des phénomènes d'adsorption (Saison *et al.*, 1999). Les tubes sont ainsi agités pendant une heure. Les tubes sont ensuite centrifugés à 2500 g pendant 10 min.

La quantité de phénanthrène adsorbée par le sol à l'équilibre est déterminée par différence entre la concentration initiale et la concentration à l'équilibre du phénanthrène, en prenant en compte la fraction qui a été adsorbée par le tube. La radioactivité du surnageant est mesurée par comptage en scintillation liquide de 1 ml de surnageant dans 10 ml d'Ultima Gold TM (Packard) avec un compteur β (Liquid Scintillation Analyzer Tricarb 2100 TR, Packard). Chaque point est la moyenne de 3 répétitions.

Les isothermes d'adsorption sont décrites pour chaque échantillon de terre par l'équation de Freundlich :

$$Q_e = K_f C_e^n \quad [4]$$

Q_e : quantité de phénanthrène adsorbée sur la phase solide à l'équilibre ($\mu\text{g g}^{-1}$)

C_e : concentration du phénanthrène dans le surnageant à l'équilibre ($\mu\text{g l}^{-1}$)

K_f, n : constantes empiriques, K_f étant le coefficient d'adsorption

3.3.4.5. Le traitement des données

Les analyses de variances sont conduites grâce au module d'analyse de la variance du logiciel STATITCF version 4.0, avec un risque de 1^{ère} espèce de 5%.

3.4. Réalisation d'un dispositif pilote : les lysimètres

L'installation d'un essai sur une friche industrielle se heurte à un problème d'hétérogénéité du matériau (chapitre 1) et à des problèmes de gestion du dispositif au jour le jour. Une alternative à ce problème est la réalisation d'un dispositif pilote placé en conditions climatiques naturelles. L'échelle du pilote est celle d'une micro-parcelle, l'avantage étant de plus sa proximité par rapport au laboratoire.

3.4.1. Les terres

Deux tonnes de chacune des terres G1 et G2 décrites dans le chapitre 1, ont été prélevées sur le site G. Les terres, tamisées à 5 cm sont homogénéisées avant de remplir les lysimètres. Leurs principales caractéristiques sont : une texture sableuse, un pH de 8,2 (G1) et 10,4 (G2) et des teneurs moyennes en 16 HAP EPA respectives d'environ 1600 et 3500 mg kg⁻¹ terre.

3.4.2. Le dispositif expérimental

L'essai se compose de 24 bacs de PVC (L 80 x l 60 x h 40 cm) disposés selon un plan expérimental en randomisation totale (Photographie 7). Les bacs sont remplis d'une couche drainante de 5 cm d'épaisseur de graviers et d'une couche de terre de 35 cm d'épaisseur, soit 180 kg environ. Les bacs sont reliés à des bonbonnes en verre (10 litres) permettant de recueillir les eaux de percolation après les épisodes pluvieux. La moitié des bacs est remplie avec G1, l'autre moitié avec G2. La mise en place a été réalisée du 23 au 27 Mars 1998.



Photographie 7 : Dispositif de lysimètres

3.4.3. Conduite des cultures

Un travail du sol de surface a été effectué manuellement. Trois lysimètres de chacune des terres sont plantés soit en ray-grass, soit en luzerne, soit avec un mélange de ray-grass et de trèfle violet, et trois lysimètres ont été laissés en sol nu, afin de constituer un témoin. Le semis a été réalisé au temps $t = 52$ jours. Les quantités de semences apportées sont celles couramment apportées en agriculture : $25 \text{ kg semences ha}^{-1}$. Ces quantités ont été doublées afin de compenser l'inhibition éventuelle de germination. Les différentes espèces n'ayant pas survécu sur la terre G2 à cause d'une toxicité dont les causes seront discutées plus avant dans ce chapitre, un second semis dans les mêmes conditions a été réalisé au temps $t = 115$ jours, lorsque les conditions d'implantation sont devenues favorables. Une fertilisation uniforme de 150 unités d'azote, phosphore et potassium (NH_4NO_3 , KH_2PO_4 et K_2HPO_4) a été réalisée chaque année, en trois apports répartis au long de la période de végétation. Le désherbage a été effectué manuellement. Les données météorologiques locales ont été enregistrées par une station météorologique implantée sur le site de l'essai de Mars 98 à Juin 2000, soit au cours des 3 saisons de végétation pendant lesquelles un suivi du dispositif a été réalisé.

3.4.4. Récoltes et analyses

3.4.4.1. Biomasse

Des coupes régulières ont été conduites en cours et en fin de saison de végétation sur tous les lysimètres plantés, de manière à maintenir les espèces dans un état végétatif. Les biomasses fraîches et sèches (48h à l'étuve à 60°C) ont été mesurées. En juin 2000, des mini-fosses ont été ouvertes dans 1/3 des lysimètres afin de caractériser les paramètres d'enracinement.

3.4.4.2. Terres

Un prélèvement est réalisé chaque année en début et fin de saison de végétation. La terre est prélevée sur la hauteur du profil en 9 points répartis sur chaque lysimètre. Les échantillons de terre sont séchés 72 h à l'air libre et température ambiante. Ils sont ensuite tamisés et traités selon le protocole décrit dans le paragraphe 3.4. du chapitre 1 de ce mémoire.

3.4.4.3. Eaux de percolation (lixiviats)

A chaque épisode pluvieux, les lixiviats de chaque lysimètre sont récupérés dans les bonbonnes. Après mesure des volumes, un échantillon de 1 litre est prélevé pour analyses. Les analyses conduites sur chaque échantillon sont : une mesure du pH et une mesure de la phytotoxicité. La phytotoxicité est évaluée par un test de germination du trèfle violet en présence des divers lixiviats bruts prélevés et d'un témoin constitué d'eau distillée. La conduite de ce test se réfère aux conditions générales des tests de germination en milieu liquide décrites dans le chapitre 1.

La teneur en HAP des lixiviats a été analysée selon le protocole mis en place pour l'analyse du phénanthrène dans les solutions nutritives d'un test de transfert et décrit dans le chapitre 2.

Chaque analyse est conduite sur un volume de 500 ml d'un échantillon composite de lixiviat. Ces échantillons composites ont été réalisés afin d'optimiser les temps d'analyse et de prendre en compte l'hétérogénéité du nombre de prélèvement au cours de chaque période. Pour chaque trimestre à partir de la mise en place de l'expérience, correspondant globalement aux quatre saisons, un mélange des différents lixiviats prélevés est réalisé pour chaque lysimètre. La contribution au mélange de chaque lixiviat prélevé tient compte du volume total percolé à la date de prélèvement considérée.

4. RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Teneur en HAP de terres rhizosphériques et non rhizosphériques d'un site d'ancienne usine à gaz

La teneur en HAP des terres rhizosphériques et non rhizosphériques prélevées au niveau des 3 profils réalisés sur le site S ont été analysées (figure 47 à 49).

La zone située autour du profil SP1 est caractérisée par une teneur moyenne en HAP des terres de surface, sans distinction entre les terres rhizosphériques et non rhizosphériques, comprise entre 50 et 500 mg kg⁻¹. Au niveau de ce profil, la teneur en 16 HAP EPA des terres rhizosphériques est toutefois inférieure à la teneur en 16 HAP EPA des terres non rhizosphériques (figure 47).

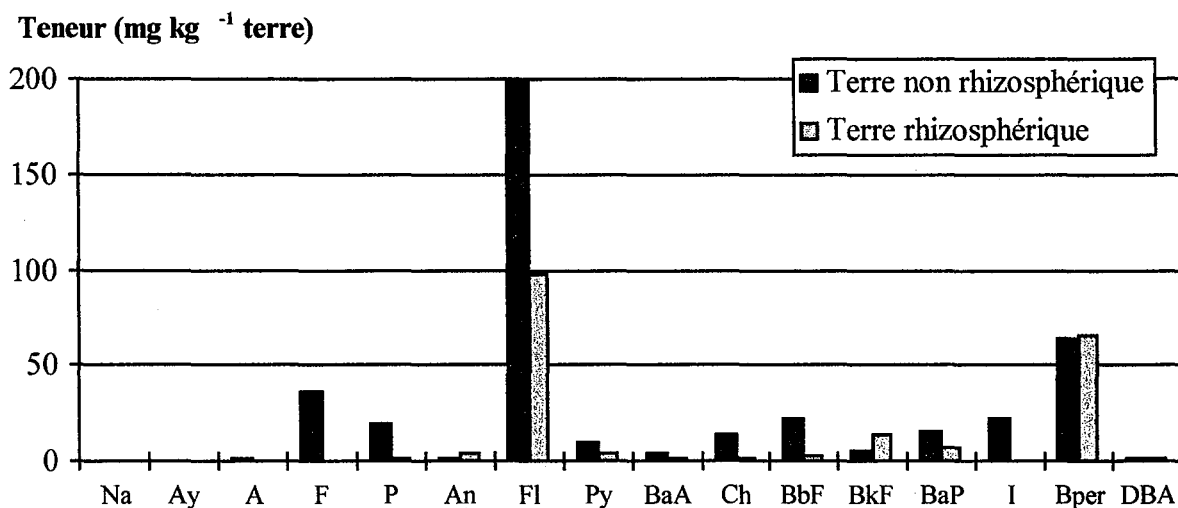


Figure 47 : Teneur en 16 HAP des terres rhizosphériques et des terres non rhizosphériques prélevées au niveau de l'horizon de surface du profil SP1. Na : naphtalène; Ay : acénaphthylène; A : acénaphthène; F : fluorène; P : phénanthrène; An : anthracène; Fl : fluoranthène; Py : pyrène; BaA : benzo[a]anthracène; Ch : chrysène; BbF : benzo[b]fluoranthène; BkF : benzo[k]fluoranthène; BaP : benzo[a]pyrène; I : indéno[1,2,3-c,d]pyrène; Bper : dibenz[g,h,i]pérylène; DBA : dibenz[a,h]anthracène.

Le profil SP2 a été réalisé dans la zone de contamination primaire du sol. Le niveau de contamination moyenne des terres de surface dans cette zone est ainsi de plus 5000 mg kg⁻¹ terre. Au niveau de l'horizon de surface du profil SP2, la terre rhizosphérique contient moins de HAP que la terre non rhizosphérique, à l'exception de l'anthracène, du benzo[k]fluoranthène et du benzo[g,h,i]pérylène (figure 48).

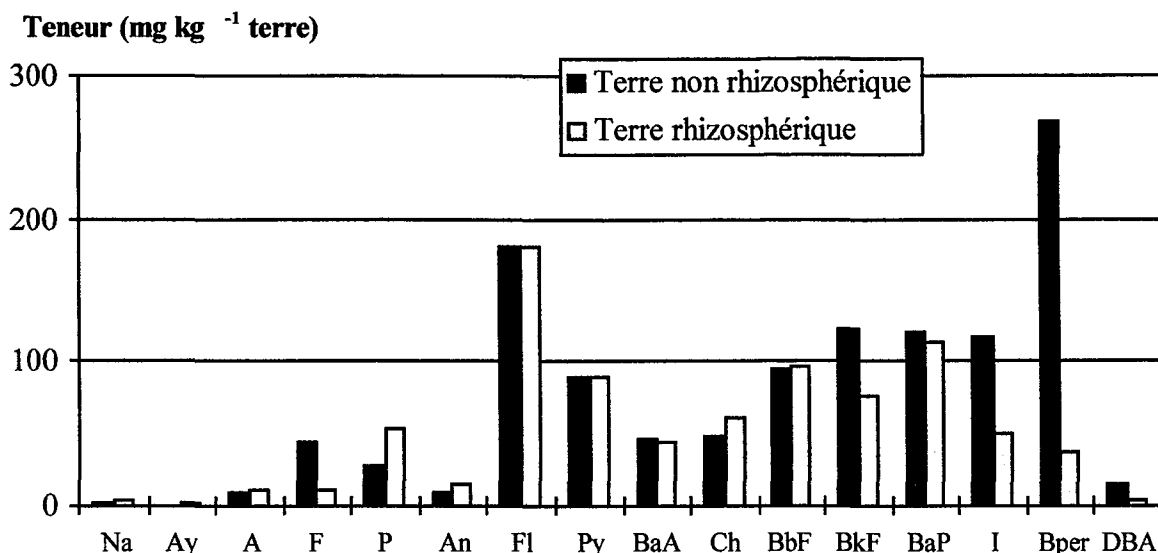


Figure 48 : Teneur en HAP des terres rhizosphériques et non rhizosphériques prélevées dans l’horizon de surface du profil SP2.

La zone dans laquelle a été creusé le profil SP3 présente une contamination moyenne des terres en HAP intermédiaire entre les niveaux de contamination des zones précédentes. La teneur en HAP de la terre rhizosphérique prélevée au niveau de ce profil est inférieure à celle de la terre non rhizosphérique (figure 49).

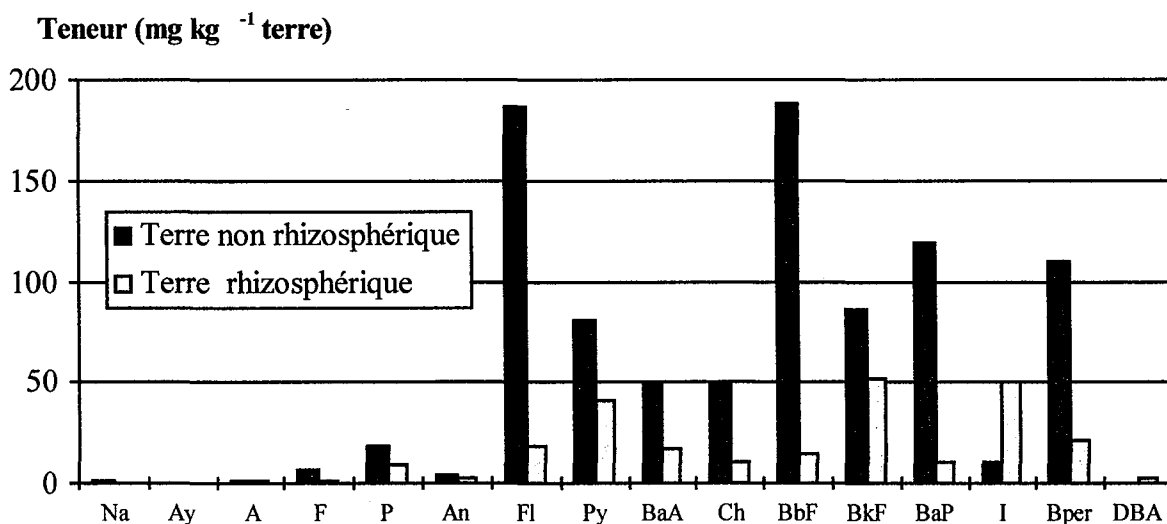


Figure 49 : Teneur en HAP des terres rhizosphériques et non rhizosphériques prélevées dans l’horizon de surface du profil SP3.

Sur les trois figures présentées précédemment, on peut remarquer la très forte abondance du fluoranthène par rapport aux autres HAP. Une telle dominance de cette molécule pourrait traduire une préservation sélective de ce HAP au cours du vieillissement du sol.

Les profils font aussi apparaître une très faible abondance relative des HAP de 3 cycles ou moins. Cette observation est d'autant plus marquée que l'on se rapproche de la source de contamination primaire (SP1 -> SP3 -> SP2), et que la quantité totale de HAP augmente. Ces résultats plaident donc en faveur de la dissipation préférentielle des HAP de plus faible poids moléculaire au cours du vieillissement des terres des horizons de surface. D'autre part, ils suggèrent que l'effet est d'autant moins sensible que le niveau de contamination est élevé. Si l'un des principaux phénomènes impliqués dans le processus de vieillissement est la dégradation biologique des HAP, il se peut donc que le niveau d'activité de la microflore soit d'autant plus faible que la teneur des terres en HAP est élevée.

Les résultats obtenus avec des terres prélevées directement sur un site d'ancienne usine à gaz suggèrent que la dissipation des HAP est plus forte dans la rhizosphère que dans la terre non rhizosphérique. L'effet de la plante sur la dissipation est d'autant moins marqué que le niveau de contamination est élevé et que le poids moléculaire des HAP considérés augmente.

Afin d'étudier plus précisément les conditions de la dissipation des HAP dans et hors la rhizosphère, des expériences en conditions contrôlées ont été menées. Ces expériences, conduites en vases de végétation, ont permis d'étudier à la fois le devenir de molécules pures, de poids moléculaires représentatifs des 16 HAP EPA, et des HAP présents dans les terres d'AUG.

4.2. Dissipation des HAP dans la rhizosphère de graminées cultivées en vases de végétation

Ce paragraphe est centré sur les résultats obtenus lors de la culture de ray-grass sur terre agricole et terre d'ancienne usine à gaz dans un dispositif de vases de végétation placé en chambre de culture.

4.2.1. Devenir des HAP purs dans la terre agricole en présence ou absence de ray-grass

4.2.1.1. Paramètres de croissance végétale

En cours d'expérience, des prélèvements ont été effectués au bout de 20, 60, 90, 135 et 170 jours. A chaque date de prélèvement, une mesure de la biomasse aérienne et de la biomasse

racinaire produites a été effectuée. Ces données nous ont ensuite servi à calculer le rapport de la biomasse aérienne à la biomasse racinaire, rapport permettant d'évaluer l'état du fonctionnement de la plante. L'évolution du rapport de la biomasse aérienne à la biomasse racinaire au cours de la culture est présentée dans le tableau 19.

Tableau 19 : Evolution du rapport de la biomasse aérienne sèche à la biomasse racinaire sèche du ray-grass au cours d'une culture de 6 mois en vases de végétation de volume réduit.

	Temps de prélèvement				
	20 jours	60 jours	90 jours	135 jours	170 jours
Terre agricole	27,3 a	2,4 a	1,9 a	1,2 a	4,86 a
Terre agricole + HAP	57,8 b	2,7 a	2,4 a	2,0 ab	5,34 a
Terre G1	3,8 b	1,0 b	1,2 b	0,7 b	5,83 a

Les valeurs d'une même colonne affectées de lettres différentes sont significativement différentes, n=5 et p=0,05

Le rapport PA/PR est très élevé au premier prélèvement du fait d'un très faible développement des racines. Entre 20 et 135 jours de croissance, le rapport diminue progressivement et reste significativement inférieur pour la terre d'ancienne usine à gaz par rapport aux autres modalités. A la fin de l'expérience, quelle que soit la modalité, les vases de végétation sont entièrement colonisés par les racines du ray-grass.

La production de biomasse aérienne augmente au cours du temps de manière identique pour toutes les modalités. Par conséquent, la diminution du rapport PA/PR traduit une augmentation plus rapide de la masse racinaire. Ainsi, une prolifération racinaire est mise en évidence pour la terre d'ancienne usine à gaz. Ces résultats confirment donc ceux obtenus sur le dispositif de rhizotrons dans le chapitre 1. Ils traduisent l'existence d'une phytotoxicité au niveau des racines, qui pourrait être directe ou due à une modification du métabolisme général de la plante, ou une stimulation de l'induction et de la croissance de racines.

Sur la terre d'ancienne usine à gaz, du fait de la prolifération racinaire et du fait que toutes les modalités ont la même production de biomasse aérienne, la quantité de biomasse aérienne produite par unité de biomasse racinaire est inférieure à celle des autres modalités. Ce résultat indique que les plantules de ray-grass ne se comportent pas de la même manière que sur la terre agricole. L'énergie produite par la plante et le carbone fixé par la photosynthèse sont vraisemblablement en partie détournés pour l'édification du système racinaire, au détriment de l'exsudation et de la production de feuilles. L'augmentation de la biomasse racinaire s'accompagne de l'augmentation de la surface de contact avec le sol et donc les HAP, et peut-

être potentiellement du nombre de microorganismes présents dans la rhizosphère. L'efficacité de l'activité physiologique des racines, l'exsudation en particulier, vis à vis du devenir des HAP présents dans la terre reste encore à démontrer. Cependant, on peut se demander, dans ce cas, quelles répercussions, positives ou négatives, les modifications racinaires observées pourraient avoir au niveau physiologique et donc sur le devenir des HAP.

Après avoir étudié les paramètres caractéristiques de la croissance du ray-grass, l'évolution de la teneur en HAP dans les différentes terres a donc été analysée en parallèle. Dans un premier temps, le devenir des HAP apportés purs dans la terre agricole a été étudié car il s'agit du système le plus simple, dans lequel la teneur de départ en HAP est parfaitement caractérisée.

4.2.1.2. Devenir des HAP purs

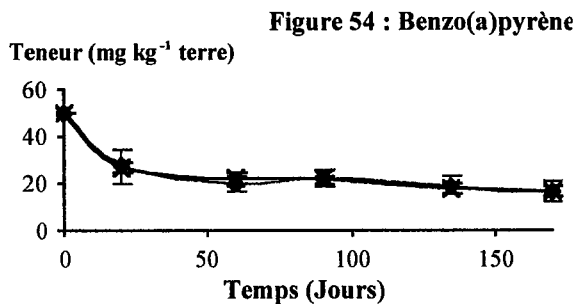
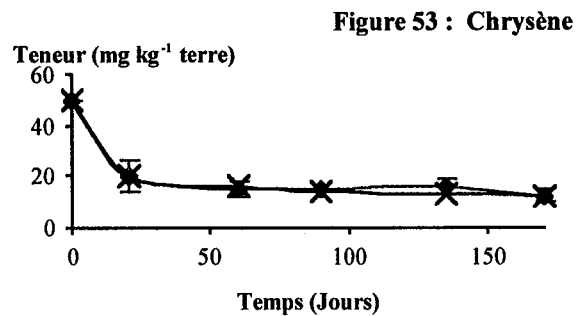
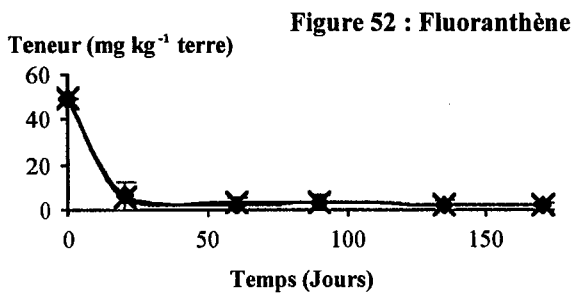
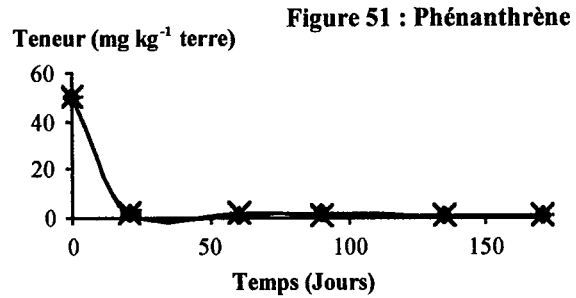
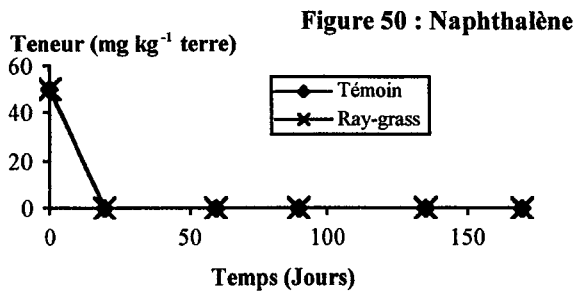
4.2.1.2.1. Résultats relatifs à la terre

L'évolution de la teneur en naphthalène, phénanthrène, fluoranthène, chrysène et benzo[a]pyrène, initialement apportés à la teneur individuelle de 50 mg kg^{-1} de terre, a été suivie au cours des 6 mois. Une forte diminution de la teneur des 5 HAP est observée dans les 20 premiers jours de l'expérience quelle que soit la molécule (figures 50 à 54).

A l'exception du naphthalène, dont la dissipation a été totale au cours des 20 premiers jours, la teneur en HAP extractibles entre 20 et 170 jours présente une diminution supplémentaire comprise entre 10 et 15% de la quantité apportée. Après 6 mois, la teneur moyenne en HAP extractibles résiduels est de 1 mg kg^{-1} (2%) pour le phénanthrène, 2 mg kg^{-1} (4%) pour le fluoranthène, $12,5 \text{ mg kg}^{-1}$ (25%) pour le chrysène et 17 mg kg^{-1} (34%) pour le benzo[a]pyrène.

Les taux de dissipation apparents des HAP sont donc de 100% pour le naphthalène, 98% pour le phénanthrène, 96% pour le fluoranthène, 87,5% pour le chrysène et 66% pour le benzo[a]pyrène. Ces valeurs sont largement supérieures aux taux de biodégradation couramment enregistrés pour ces molécules (Wild & Jones, 1992; Oudot, 1994). Il y a donc de fortes présomptions pour que la biodégradation ne soit pas le seul phénomène impliqué dans le devenir des HAP purs. Toutefois, l'intensité de la dissipation est fonction des propriétés physico-chimiques des molécules comme le poids moléculaire et la solubilité. Dans un second temps l'évolution de la teneur en HAP a donc été appréhendée plus finement.

Figures 50 à 54 : Evolution de la teneur en HAP purs dans la terre agricole plantée ou non en ray-grass au cours des 6 mois de culture en vases de végétation.



4.2.1.2.2. Différentes formes des HAP dans le sol et leur évolution reliées aux résultats expérimentaux

L'évolution de la teneur des 5 HAP dans la terre agricole présente deux phases au cours desquelles le comportement des molécules est différent. La première phase, d'une durée de 3 semaines environ, est caractérisée par un taux de dissipation élevé (tableau 20). Ce taux diminue quand le poids moléculaire de la molécule augmente. La seconde phase est caractérisée par de faibles taux de dissipation. Ce taux augmente quand le poids moléculaire augmente.

Tableau 20 : Taux journalier de dissipation des HAP purs dans la terre agricole plantée (ou non plantée) en ray-grass . Résultats exprimés en mg kg⁻¹ terre j⁻¹.

	Phase 1 : 0-20 jours	Phase 2 : 20-170 jours
Naphtalène	2,5	0,0000
Phénanthrène	2,4	0,0088
Fluoranthène	2,2	0,0267
Chrysène	1,5	0,0507
Benzo[a]pyrène	1,1	0,0703

Afin d'essayer d'expliquer ce comportement, on peut considérer successivement les processus de dissipation des HAP, et des molécules organiques en général, dans un sol. Ceux-ci peuvent être : la volatilisation, le lessivage, la dégradation et/ou la minéralisation et la séquestration au sein des constituants du sol (Barriuso *et al.*, 1996).

Pour les HAP comme le phénanthrène, la volatilisation est un facteur non négligeable de dissipation. On ne peut pas, au niveau du dispositif expérimental utilisé, exclure cette voie étant donnée la petite taille des dispositifs, qui, en chambre de culture, subissent un certain échauffement. Cependant la volatilité des HAP lourds est négligeable, ce qui ne permet donc pas d'expliquer l'ensemble des résultats obtenus.

Dans les sols agricoles, il existe une microflore qui possède naturellement les capacités à dégrader les HAP. Ces capacités de dégradation sont le plus souvent présentes à l'état latent et sont stimulées lors d'un apport de HAP. Cette induction se traduit en général par une phase de latence de 1 à 4 mois, mais peut être quasi instantanée comme l'a mis en évidence Chaîneau (1995) pour les hydrocarbures dont les HAP. Il n'est donc pas exclu, qu'au niveau de cette expérience, une partie au moins des HAP purs apportés aient été dégradés et/ou minéralisés par une microflore qui s'est adaptée très vite ou dont les capacités enzymatiques ont été induites rapidement.

Dans le sol, les HAP et les autres polluants organiques se trouvent sous trois formes (Verstraete & Devliegher, 1996) : une fraction facilement extractible (biodisponible), une fraction difficilement extractible (emploi de solvant) et une fraction non extractible. L'existence de ces trois formes résulte de la capacité de rétention des molécules organiques du sol vis à vis des molécules hydrophobes. Il était donc important d'examiner comment l'existence de ces trois fractions pouvait contribuer à expliquer les résultats présentés.

La fraction biodisponible se compose du polluant présent en phase gazeuse ou dissoute et du polluant faiblement adsorbé à la surface des composés organiques du sol. Cette fraction adsorbée repasse facilement dans la phase aqueuse. Elle peut donc être rapidement métabolisée ou volatilisée en quelques jours, la vitesse d'épuisement de la fraction dissoute entretenant le flux de désorption (Verstraete & Devliegher, 1996; Chung & Alexander, 1998). La première phase de dissipation des HAP purs dans la terre agricole, caractérisée par un fort taux de dissipation en fonction de la taille et de la solubilité des molécules, entre tout à fait dans ce schéma. De plus, l'échauffement dû à l'éclairage a pu aider à la désorption et à la volatilisation des produits. La volatilité relativement élevée du fluoranthène par rapport à une molécule de poids moléculaire proche comme le chrysène, et son taux de dissipation apparent du même ordre que celui d'une molécule de faible poids moléculaire est un argument en faveur de cette hypothèse.

Une seconde fraction du polluant présente dans le sol peut migrer vers des sites moins accessibles au sein des constituants des sols. De ce fait, suivant les caractéristiques des sites vers lesquels les molécules migrent, celles-ci sont présentes sous plusieurs niveaux de biodisponibilité dans un même sol. La biodégradation de ces formes différemment disponibles est alors en général limitée par leur vitesse de désorption. Plus la molécule est hydrophobe, plus elle a de chance de se retrouver au sein des matières organiques et d'y constituer un stock plus ou moins stable. Le stock est ainsi potentiellement plus élevé dans le cas du benzo[a]pyrène que dans celui du phénanthrène.

L'existence de la seconde phase de dissipation confirme cette hypothèse et peut donc être attribuée à la désorption très lente d'une partie de la fraction ayant migré pendant la première phase de dissipation vers des sites peu accessibles des constituants du sol. La quantité de benzo[a]pyrène désorbée est supérieure à celle du phénanthrène vraisemblablement parce que le stock constitué lors de la première phase est plus important. Cette hypothèse signifierait que le passage des HAP de l'état biodisponible à l'état moins biodisponible a été particulièrement rapide dans cette expérience (20 jours). Toutefois, cette observation est parfaitement corroborée par les travaux de Kohl & Rice (1998), qui ont évalué la durée maximum de ce passage à 30 jours. Après 6 mois, entre 2 et 34% des HAP sont encore retrouvés dans cette fraction. Si l'on avait poursuivi l'expérience, il est possible que des HAP présents dans cette fraction peu disponible se seraient progressivement dissipés. Toutefois, étant donnés les faibles taux de dissipation enregistrés, il aurait sans doute fallu une période supplémentaire d'au moins 6 mois.

La troisième fraction est enfin constituée des HAP et de leurs métabolites piégés dans les substances humiques. Seule une modification d'ordre physico-chimique de ces molécules permet de récupérer les polluants qui y sont piégés (Eschenbach *et al.*, 1998). Nous avons donc procédé à la déstructuration des matières organiques des terres ayant subi 6 mois de traitement, afin d'en étudier la teneur en HAP non extractibles par les solvants.

De cette manière, l'existence de cette fraction non extractible par les solvants a pu être mise en évidence pour quatre des cinq HAP apportés. Les quantités mises en jeu sont largement inférieures à celles présentes sous forme extractible (figure 55).

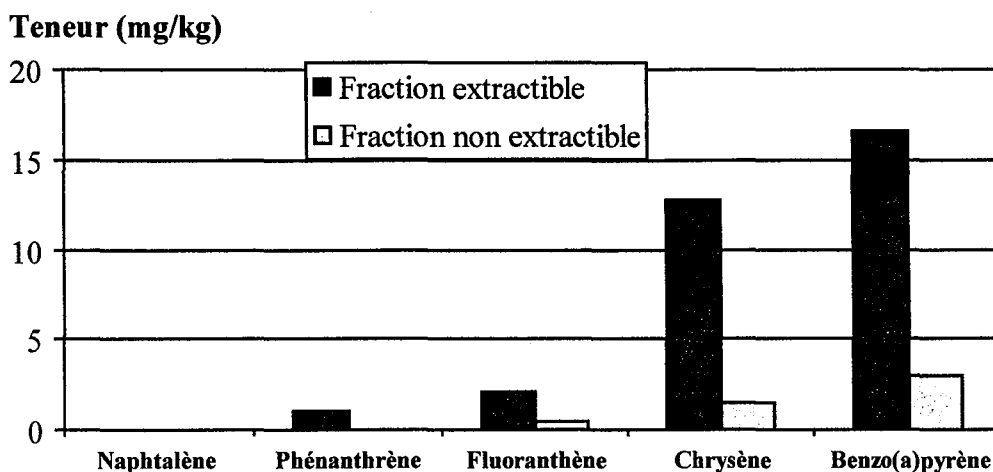


Figure 55 : Teneur moyenne en cinq HAP extraits par le solvant de la terre agricole plantée ou non plantée en ray-grass après 6 mois de culture en vases de végétation, et teneur en HAP récupérés après déstructuration des matières organiques de ces échantillons extraits.

Les quantités extraites vont de 0 pour le naphthalène jusqu'à 3 mg kg⁻¹ de terre pour le benzo[a]pyrène (12% du produit apporté). Aucun HAP n'est extrait de la terre agricole témoin.

Même en prenant en compte cette fraction liée, le taux de dissipation des molécules pures reste cependant élevé par rapport aux valeurs couramment admises. Toutefois, seule l'analyse des molécules mères piégées a été conduite. Or les métabolites des HAP sont des molécules fonctionnalisées. Elles sont ainsi plus susceptibles d'être incorporées chimiquement dans les matières organiques (Richnow *et al.*, 1994). Etant donné que l'action de la biodégradation ne peut être exclue dans cette expérience, il pourrait y avoir une quantité non négligeable de produits dérivés des HAP dans les matières organiques. Ces quantités ont été évaluées à 20% du carbone apporté par les HAP (Ressler *et al.*, 1999) dans des conditions comparables à celles utilisées dans ce travail. S'il l'on prend en compte une telle fraction, les valeurs

expérimentales de dissipation que nous avons obtenues sont plausibles par rapport à celles de la littérature.

4.2.1.2.3. Modélisation tri-compartimentale

Les résultats expérimentaux discutés précédemment peuvent donc être modélisés en considérant la répartition des produits apportés dans trois compartiments comme décrit dans les travaux de Karickhoff (1980) cité par Scow & Jonhson (1997) : un compartiment labile à dissipation rapide, un compartiment comprenant les produits adsorbés mais qui restent labiles à plus long terme et un compartiment contenant les produits résistants, non extractibles par les solvants (Figure 56).

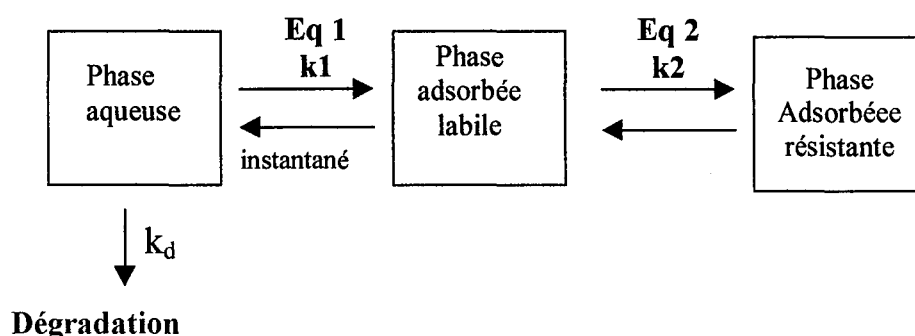


Figure 56 : Compartiments représentant les différentes formes des HAP dans le sol, relations entre compartiments et conséquences sur le devenir des HAP.

Au niveau du dispositif de vases de végétation, l'apport de HAP est réalisé dans la phase aqueuse. Durant la phase 1, la diminution de teneur en HAP purs provient de la dégradation de la fraction en phase aqueuse, du passage de HAP de la phase aqueuse vers la phase adsorbée labile (équilibre 1, rapide) puis vers la phase résistante (équilibre 2, moins de 20 jours). La phase 2 correspondrait alors à la désorption suivie de la dissipation d'une partie de la fraction adsorbée labile et/ou résistante (équilibres 1 et 2). La capacité des HAP à repasser de la phase résistante vers une phase plus labile reste cependant hypothétique. Si ce phénomène a bien été mis en évidence pour des résidus de pesticides (Schiavon *et al.*, 1990; Novak, 1998), son importance semble en effet moindre pour les HAP (Eschenbach *et al.*, 1998).

4.2.1.2.4. Résultats relatifs à la présence ou à l'absence de plante

Bien que le ray-grass soit une espèce considérée comme efficace pour stimuler la dissipation des HAP, notamment d'après les travaux d'Aprill & Sims (1990), aucun effet de la plante n'a

été mis en évidence. Si l'on considère le modèle tri-compartimental et le jeu des équilibres entre les compartiments, ce résultat pourrait découler d'un décalage temporel entre le développement de la plante et le devenir des HAP apportés dans la phase aqueuse au temps 0. Avant 20 jours, le développement du ray-grass n'était certainement pas suffisant pour avoir un réel effet sur les HAP. Ces résultats suggèrent d'autre part que la plante n'agit pas sur les compartiments contenant les phases adsorbées et résistantes du polluant, du moins à l'échelle de temps où les expériences ont été conduites.

4.2.3. Evolution des HAP dans la terre d'ancienne usine à gaz lors d'une mise en culture de 6 mois

La teneur en HAP extractibles de la terre d'ancienne usine à gaz n'a pas évolué au cours des 6 mois de l'expérience, que ce soit sous système planté ou non planté (tableau 21).

Aucun effet mesurable de la présence de plante sur l'évolution de la teneur en HAP n'est mis en évidence pour 15 des 16 HAP EPA. Seule la teneur en fluorène de la terre des vases plantés est significativement inférieure à celle des vases non plantés et ce quelle que soit la date de prélèvement. Aucune explication logique n'a été entrevue pour expliquer ce comportement particulier, aussi s'agit-il peut-être d'une observation fortuite.

Tableau 21 : Evolution de la teneur en HAP de la terre d'AUG G1 plantée ou non en ray-grass au cours des 6 mois de mise en culture en vases de végétation.

Date	0 jours	20 jours	60 jours	90 jours	135 jours	170 jours
Teneurs en mg par kg terre						
Naphthalène						
Témoin	2,6 a	5,0 a	3,6 a	3,9 a	3,9 a	3,2 a
Planté	2,6 a	4,5 a	3,2 a	3,3 a	2,7 a	2,7 a
Acénaphthylène						
Témoin	3,7 a	4,5 a	3,2 a	3,5 a	3,7 a	3,0 b
Planté	3,7 a	3,9 a	2,9 a	3,9 a	3,4 a	3,4 b
Acénaphthène						
Témoin	2,1 ab	2,1 a	1,7 b	1,5 ab	1,7 ab	1,2 ab
Planté	2,1 ab	1,6 a	1,0 b	2,2 ab	1,6 ab	1,9 ab
Fluorène						
Témoin	6,3 a	7,8 a	6,6 a	8,1 a	8,0 a	5,8 a
Planté	6,3 a	6,6 b	4,5 b	6,9 b	4,9 b	4,1 b

Phénanthrène						
Témoin	23,2 a	22,7 a	17,8 a	18,3 a	21,2 a	16,1 a
Planté	23,2 a	21,9 a	15,2 a	22,4 a	17,3 a	18,8 a
Anthracène						
Témoin	10,8 a	11,2 a	8,3 a	8,5 a	9,7 a	9,2 a
Planté	10,8 a	10,6 a	7,5 a	11,1 a	8,3 a	7,2 a
Fluoranthène						
Témoin	55,8 a	56,1 a	45,4 a	47,0 a	55,5 a	42,7 a
Planté	55,8 a	50,8 a	40,3 a	61,4 a	49,5 a	52,8 a
Pyrène						
Témoin	41,0 a	45,4 a	40,7 a	39,0 a	46,8 a	38,3 a
Planté	41,0 a	43,5 a	33,5 a	47,1 a	37,1 a	41,1 a
Benzo(a)anthracène						
Témoin	28,2 a	27,3 a	21,1 a	22,6 a	27,3 a	18,5 a
Planté	28,2 a	23,5 a	19,2 a	26,6 a	21,0 a	24,7 a
Chrysène						
Témoin	18,8 a	18,5 a	15,0 a	15,0 a	18,6 a	14,6 a
Planté	18,8 a	16,7 a	13,6 a	22,1 a	16,8 a	19,3 a
Benzo(b)fluoranthène						
Témoin	25,0 a	24,2 a	20,0 a	19,7 a	25,2 a	20,0 a
Planté	25,0 a	20,9 a	18,2 a	30,5 a	22,7 a	27,9 a
Benzo(k)fluoranthène						
Témoin	23,2 a	23,2 a	17,7 a	19,0 a	24,0 a	18,7 a
Planté	23,2 a	20,0 a	16,9 a	29,2 a	21,7 a	25,8 a
Benzo(a)pyrène						
Témoin	26,0 a	20,8 a	26,1 a	22,1 a	32,8 a	26,5 a
Planté	26,0 a	24,7 a	20,6 a	38,2 a	25,8 a	36,7 a
Indéno(123-cd)pyrène						
Témoin	12,2 a	17,9 a	9,4 a	9,0 a	11,9 a	9,3 a
Planté	12,2 a	9,9 a	8,0 a	15,0 a	10,2 a	13,9 a
Benzo(ghi)pérylène						
Témoin	15,6 a	12,4 a	7,5 a	9,6 a	12,2 a	8,7 a
Planté	15,6 a	8,6 a	8,1 a	19,3 a	11,8 a	16,4 a
Dibenz(ah)anthracène						
Témoin	6,5 a	2,8 ab	1,8 ab	2,1 b	3,0 ab	1,6 ab
Planté	6,5 a	1,7 ab	1,3 ab	4,0 b	3,0 ab	4,1 ab

Pour chaque composé, les valeurs affectées de lettres différentes sont significativement différentes, n=5, p=0,05.

Les écart-types obtenus pour les teneurs en HAP des substrats plantés sont inférieurs à ceux obtenus pour les substrats non plantés. Ce résultat semble montrer qu'une homogénéisation des substrats a eu lieu en cours de culture.

Les HAP de la terre d'ancienne usine à gaz présentent donc un comportement totalement différent de celui des HAP purs. Ce comportement révèle une différence de biodisponibilité du composé dans le sol. De même que pour l'expérience conduite en vases de végétation, on peut essayer de relier ces résultats au modèle tri-compartimental des HAP dans un sol. Les terres d'ancienne usine à gaz ont subi une évolution en conditions naturelles depuis plus de 30 ans. La fraction biodisponible des HAP au départ a vraisemblablement été biodégradée rapidement. Les HAP restants ont pu migrer vers des sites peu ou pas accessibles de la matrice sol-goudron. Les HAP présents actuellement sont donc vraisemblablement majoritairement sous forme stable, résistante à l'extraction. Ils sont de plus apparemment non remobilisables, du moins à l'échelle d'une saison de culture. Le goudron, en colmatant les pores, a cependant pu contribuer à limiter l'interface au niveau de laquelle a lieu le passage en solution, et donc la remobilisation d'une fraction qui aurait été extractible sans sa présence.

L'ensemble des phénomènes décrits permet de bâtir de nouvelles hypothèses pour déterminer pourquoi la teneur en HAP n'a pas évolué dans la terre d'ancienne usine à gaz, contrairement aux HAP purs dans la terre agricole. En ce sens ces travaux corroborent ceux de Burford *et al.* (1993), Erickson *et al.* (1993), Richnow *et al.* (1995, 1997) ou Bidaud & Tran-Minh (1997), qui montrent que les HAP ajoutés dans un sol, quel qu'il soit, sont dissipés au contraire des HAP qui y étaient éventuellement présents avant l'apport.

4.2.4. Conclusions

De manière générale, ces résultats montrent que même en conditions optimisées, et malgré l'utilisation d'une plante potentiellement efficace vis à vis de la dissipation des HAP dans ces conditions (Aprill & Sims, 1990), aucune stimulation de la dissipation des HAP en présence de plante n'est observée. Cette remarque est valable non seulement pour les HAP de la terre d'ancienne usine à gaz mais aussi pour les HAP purs, ce qui s'oppose aux résultats antérieurement décrits (Aprill & Sims, 1990; Ferro *et al.*, 1994; Schwab & Banks, 1994; Günther *et al.*, 1996; Reilley *et al.*, 1996; Schwab *et al.*, 1994).

Le dispositif expérimental de vase de végétation de faible volume imposait cependant une contrainte au développement racinaire du ray-grass. Or, les paramètres liés à la rhizosphère sont des facteurs clés de notre étude. Par conséquent, il était important de vérifier si cette contrainte avait pu avoir un effet défavorable sur la capacité du système à dissiper les HAP.

Afin de s'en affranchir, une seconde expérience a été mise en place, en utilisant des colonnes de sol de 50 cm de profondeur. Ce dispositif expérimental a ainsi permis le développement racinaire de trois graminées rustiques dans des conditions de profondeur représentatives de celles qu'elles rencontrent normalement dans les sols sur le terrain.

4.3. Etude du devenir des HAP d'une terre d'ancienne usine à gaz en colonnes de sol

4.3.1. Paramètres de croissance

Afin de contrôler le bon fonctionnement du dispositif, la production de biomasse aérienne a été suivie au cours des 6 mois de l'expérience. A l'arrêt de l'expérience, la masse racinaire présente dans les différentes tranches des colonnes a été pesée afin d'en déterminer la densité. La production de biomasse aérienne a augmenté au cours du temps pour l'ensemble des espèces. Le dactyle et la fétuque ont un rendement supérieur à celui du brome. La fétuque compense une pousse plus lente par une meilleure densité. Quelle que soit l'espèce, la densité racinaire, évaluée par la masse racinaire sèche diminue quand la profondeur augmente (tableau 22). Les racines atteignent systématiquement le fond du dispositif. Cependant, la plus forte densité racinaire est observée dans la couche superficielle.

Tableau 22 : Biomasse racinaire récoltée à 180 jours dans les différentes couches des colonnes de terre d'ancienne usine à gaz plantées en brome, dactyle, fétuque ou un mélange des 3 espèces. Résultats exprimés en g MS.

	Profondeur (cm)				
	0-10 cm	10-18 cm	18-26 cm	26-34 cm	34-42 cm
Brome	5,17 a	1,03 b	0,76 bc	0,46 c	0,41 c
Dactyle	7,18 a	1,26 b	0,59 bc	0,27 c	0,11 c
Fétuque	5,60 a	0,77 b	0,48 bc	0,48 c	0,16 c
Mélange	6,60 a	1,19 b	0,57 bc	0,26 c	0,41 c

Les valeurs affectées de lettres différentes sont significativement différentes, n=5 et p=0,05.

La teneur en HAP des différentes couches a ensuite été analysée afin d'en étudier le profil en fonction de la profondeur d'une part, et de la culture d'autre part.

4.3.2. Teneur en HAP de la terre

Dans la zone de plus forte densité racinaire (0-10 cm), la teneur en HAP de la terre après 180 jours de traitement n'est pas différente de la teneur initiale (figure 57). Seule la teneur en HAP

de la modalité témoin semble diminuer. Pour certains HAP comme le phénanthrène, la teneur de la terre des systèmes plantés augmente, mais de manière non significative, par rapport à la teneur initiale et à celle de la modalité témoin.

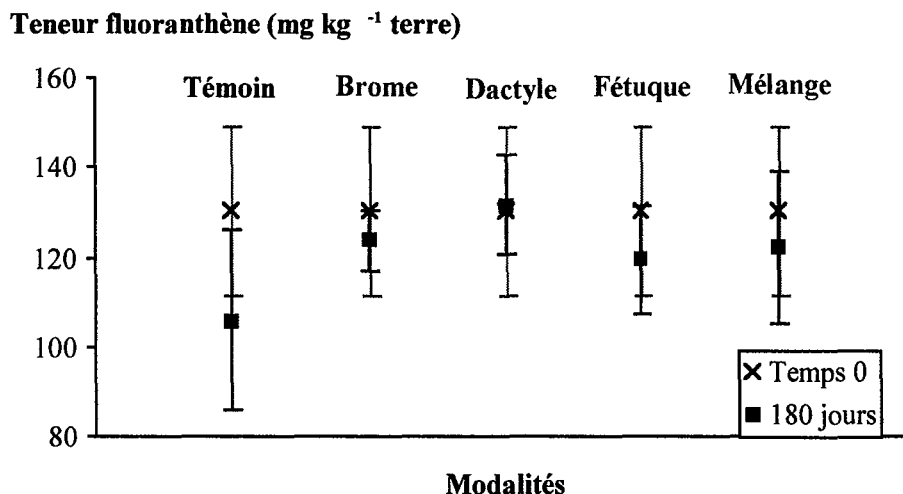


Figure 57 : Teneur en HAP dans le niveau de surface (0-10 cm) à la mise en place et après 180 jours de culture des colonnes non plantées et des colonnes plantées (exemple du fluoranthène).

Dans la zone de plus faible densité racinaire (34-42 cm), la teneur en HAP de la terre des modalités témoin après 180 jours n'est pas significativement différente de la teneur initiale (figure 58). La teneur en HAP de tous les systèmes plantés après 180 jours est inférieure à la teneur initiale. Il n'y a pas de différence significative entre les plantes.

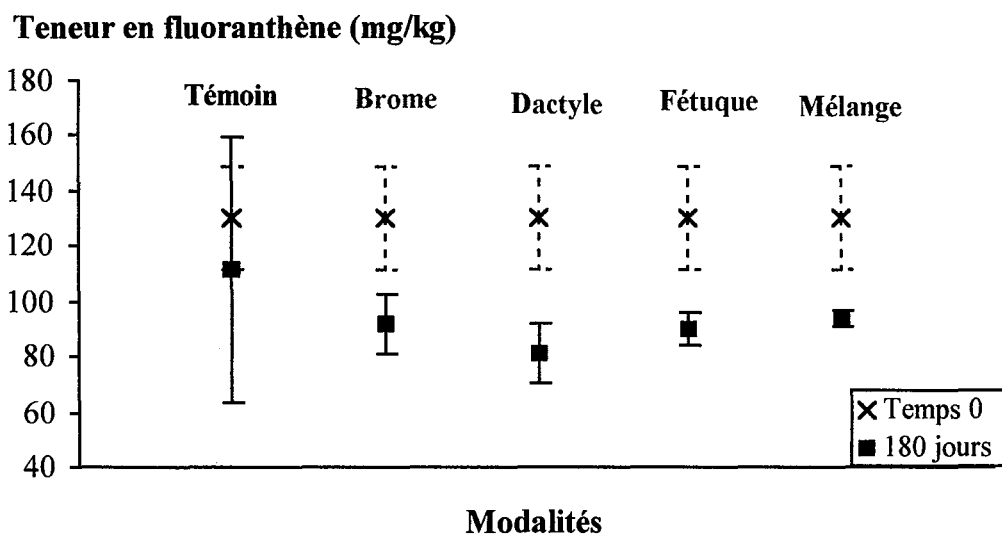


Figure 58 : Teneur en HAP de la terre de profondeur (34-42 cm) à la mise en place et après 180 jours en fonction du traitement (planté ou non) (exemple du fluoranthène).

Il apparaît une différence de comportement entre les colonnes plantées et non plantées. Au niveau des colonnes plantées, il existe une diminution significative de la teneur en HAP extraits en fonction de la profondeur. Ce phénomène concerne uniquement la zone la plus profonde pour les modalités témoin. Pour les modalités plantées, il existe un effet significatif dès 18 cm de profondeur (figure 59).

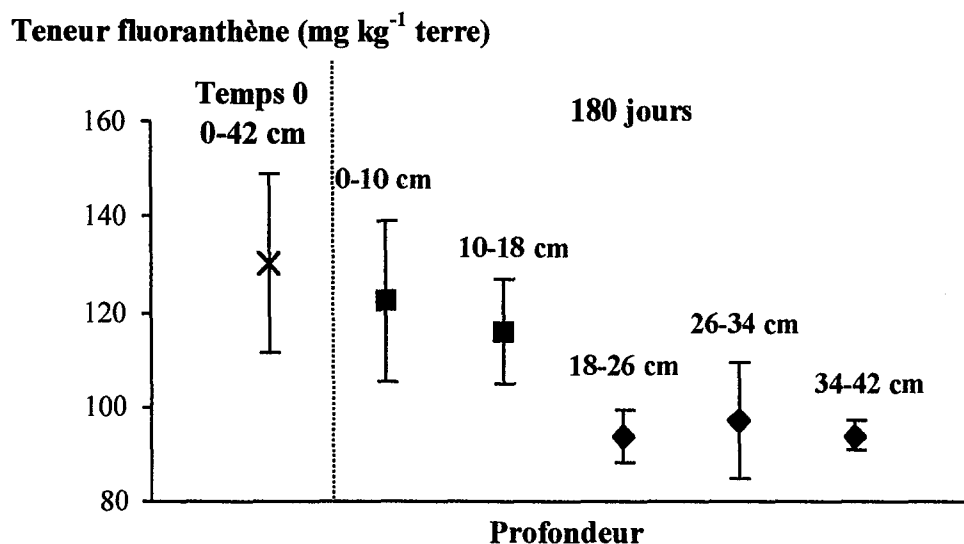


Figure 59 : Teneur en HAP après 180 jours des colonnes (n=5) plantées avec l'association des 3 espèces graminées (brome, dactyle et fétuque) en fonction de la profondeur comparée à la teneur de départ : cas du fluoranthène.

Les couches de surface des colonnes se sont comportées de la même manière que les vases de végétation de volume réduit remplis de terre d'ancienne usine à gaz vis à vis de l'évolution de la teneur en HAP des terres. L'absence d'évolution de la teneur en HAP constatée sur les vases, en présence ou absence de plantes, est donc aussi mise en évidence en dispositif non limitant pour les racines. Les couches de terre concernées sont celles pour lesquelles la densité racinaire est la plus élevée, densité comparable à celle observée sur les vases de végétation.

Les profils de HAP en fonction de la profondeur obtenus tendent à confirmer les limites de l'emploi de systèmes de culture de petite taille. Ceux-ci sont généralement mis en place afin que l'ensemble de la terre du vase de végétation puisse être considérés comme rhizosphérique car totalement colonisée par les racines. Or, les résultats obtenus précédemment avec de tels systèmes montrent que ceux-ci tendent à modifier les cinétiques de production de la biomasse aérienne et qu'aucune évolution de la teneur des HAP de la terre d'ancienne usine à gaz n'a lieu. Les résultats obtenus avec un système non limitant pour les racines montrent au contraire qu'une diminution de la teneur en HAP est observée en profondeur, ce qui suggère qu'une

partie des HAP, que l'on pouvait supposer à priori, d'après les résultats du paragraphe 4.2. sur la terre d'AUG, présents dans la phase résistante du modèle tri-compartmental, est en fait mobilisable, même sur une courte durée. Un «effet plante» serait de plus mis en évidence puisque l'augmentation de la dissipation des HAP en profondeur est significative dès 18 cm pour les systèmes plantés contre 34 cm pour les colonnes non plantées

Trois phénomènes sont proposés pour expliquer ces résultats expérimentaux : le lessivage, l'action du flux transpiratoire de la plante, et une différence dans la capacité de rétention des HAP de la terre. Le phénomène de lessivage ne permet pas d'expliquer la déplétion de HAP observée car aucune fuite de HAP n'a pu avoir lieu, le fond des colonnes étant fermé de manière étanche.

L'humidité de la terre est supérieure dans les couches profondes du fait de l'arrosage vertical. Or l'humidité limite l'adsorption des polluants sur la phase organique et favorise leur passage dans la voie aqueuse (Thiele & Brümmer, 1998; Chaîneau *et al.*, 2000). De plus, la présence de racines très développées modifie la migration de l'eau. En effet, l'humidité est homogène pour les colonnes plantées alors que sur le témoin, la couche profonde est toujours plus humide que les zones situées au dessus. Entre deux arrosages, le flux transpiratoire a pu contribuer à la remontée (Clothier & Green, 1997) d'une partie de l'eau par capillarité dans la colonne, entraînant les polluants dissous. Un tel phénomène expliquerait que la teneur en HAP dans la couche de surface ait parfois tendance à augmenter. Les travaux de Liste & Alexander (2000a et b) corroboreraient par ailleurs cette hypothèse. La signification de ce phénomène reste cependant à caractériser.

Une protection des HAP sous l'effet de la plante a pu avoir lieu. Il est, en effet, reconnu que la plante protège une partie des matières organiques du sol à l'égard de processus comme l'humification (Haider *et al.*, 1989). De plus, dans les sols à forte activité biologique comme les sols rhizosphériques, la biodisponibilité des HAP peut être limitée par leur incorporation dans la matière organique (Guthrie & Pfaender, 1998). Afin d'étudier cette hypothèse nous avons réalisé des isothermes d'adsorption du phénanthrène sur les terres de surface et de profondeur des colonnes témoin et des colonnes plantées avec le mélange d'espèces, ainsi que sur la terre initiale. Le but de cette expérience était la caractérisation de la capacité de ces échantillons de terre à retenir les HAP.

4.3.3. Caractérisation de la capacité de rétention des terres

Les isothermes d'adsorption sont décrites par le modèle mathématique de Freundlich :

$$Q_{ads} = K_f \cdot C_e^{1/n}$$

Avec Qads la quantité de phénanthrène par unité de masse de sol à l'équilibre ($\mu\text{g g}^{-1}$), K_f et n les constantes de régression du modèle et C_e la concentration à l'équilibre du phénanthrène dans la solution. Le coefficient K_f est le coefficient d'adsorption du phénanthrène au sol, le coefficient n décrit l'évolution de l'adsorption au sol quand la concentration en solution aqueuse du phénanthrène augmente. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 23.

Tableau 23 : Coefficients K_f des terres de surface et de profondeur, au début et à la fin de l'expérience. Cas des colonnes témoin et des colonnes plantées avec le mélange d'espèces.

Témoin à 180 jours		Mélange à 180 jours
7,00	Surface	8,6
	Départ : 5,23	
3,94	Profondeur	4,8

Ces résultats montrent donc qu'il existe bien une différence dans la capacité d'adsorption des terres entre les couches de surface des colonnes et les couches de profondeur. Les terres de profondeur ont une capacité à adsorber le phénanthrène proche de celle de la terre de départ. Par contre, sous l'effet de l'arrosage, de la fertilisation, et peut être de l'action de la microflore, une augmentation de la réactivité des terres a eu lieu en surface. Cette augmentation de réactivité a été légèrement stimulée en présence de plantes et pourrait donc être due à une variation de l'environnement chimique des molécules organiques du sol sous l'effet des pratiques culturales. Toutefois des expériences complémentaires de caractérisation des matières organiques (Bruckert *et al.*, 1978) seraient nécessaires pour affiner cette hypothèse. Si l'on considère qu'une partie des HAP était au départ potentiellement mobilisable sur 6 mois, il semble par ailleurs vraisemblable que les pratiques culturales utilisées aient contribué à en bloquer une fraction sous forme non mobilisable. Ce résultat correspondrait alors au carbone qualifié de « structurellement labile mais physiquement bloqué » décrits dans les travaux de Balesdent *et al.* (1988).

4.3.4. Conclusions

En dispositif non limitant pour le développement des racines, une stimulation de la dissipation des HAP de la terre d'AUG a été mis en évidence en profondeur, en présence de plantes en particulier. La teneur en HAP n'évolue pas dans les terres de surface. Ce résultat différencié a

pu en partie être relié à une évolution de la réactivité de la terre vis à vis des HAP au cours du temps.

Les résultats obtenus avec les vases de végétation et les molécules pures vont à l'encontre des données bibliographiques. D'autre part, aucune dissipation des HAP n'est enregistrée dans la terre d'AUG dans ce dispositif. En dispositif non limitant au contraire, un effet de la plante sur la dissipation est détecté en profondeur. Nous avons tenté d'expliquer ces résultats, en particulier grâce aux différentes formes sous lesquelles les HAP peuvent se trouver, et en terme de passage d'un état de biodisponibilité à un autre. Un modèle permettant de synthétiser ces hypothèses a donc été utilisé. Ce modèle considère que les HAP se répartissent entre trois compartiments dans le sol : la phase aqueuse, à partir de laquelle a lieu la dissipation, la phase adsorbée labile, qui peut alimenter la phase aqueuse à la suite de la désorption plus ou moins rapide des produits, et la phase adsorbée résistante. La migration des HAP dans cette dernière fraction est rapide. De plus, le passage de HAP présents dans cette fraction vers un état plus disponible reste hypothétique.

Par rapport à ce qui avait été observé sur site, l'effet de la rhizosphère sur le devenir des HAP d'une terre d'AUG peut être qualifié de discret en système de laboratoire. Ces systèmes ont cependant été optimisés, en terme d'échelle et d'itinéraire technique, de manière à pouvoir observer une dissipation éventuelle. Or, si ce type de dispositif peut fournir des informations précieuses sur les phénomènes étudiés, il n'est pas forcément transposable à la réalité d'un phytotraitement ou de ce qui se passe sur site. Les principaux obstacles à cette transposition, obstacles qui pourraient expliquer le décalage des résultats entre le terrain et le laboratoire, sont, d'une part, le changement d'échelle et, d'autre part, les conditions climatiques, qui ne sont pas optimisées en permanence. Le changement d'échelle se situe à la fois en termes de taille du dispositif et au niveau temporel, puisque la durée des phénomènes dont on mesure les résultats sur le terrain avoisine 30 ans, alors que la durée des expériences mises en place en laboratoire n'est que de 6 mois.

Par ailleurs, le traitement des terres d'anciennes usines à gaz n'est pas envisagé directement sur le site car l'hétérogénéité verticale de la pollution ne le permet pas. Par contre, la mise en place d'un dispositif de cellules de traitement *in-situ* des terres excavées est tout à fait envisageable.

Dans cette optique, un dispositif pilote de lysimètres a donc été mis en place en 1998 afin d'étudier, à plus grande échelle et en conditions naturelles, l'impact des plantes sur le devenir des HAP. Afin de simuler le phytotraitement, nous avons utilisé des terres brutes

d'excavations tamisées à 5 cm. Ces lysimètres ont été conduits selon un itinéraire technique simplifié et ont été suivis pendant trois saisons de végétation.

4.4. Etude du devenir des HAP dans un système pilote de lysimètres

Trois types de paramètres ont été analysés au cours des 2,5 années de culture sur les lysimètres : ceux liés aux végétaux (permettant de mettre en évidence l'implantation et la colonisation des terres par des végétaux), ceux liés aux eaux de percolation (donnant accès aux paramètres de la mobilité des HAP dans le dispositif au cours du traitement) et ceux liés à l'évolution des HAP de la terre (permettant de tester l'efficacité de la rhizosphère pour dépolluer).

4.4.1. Paramètres de développement végétal

L'implantation des végétaux la première année a été difficile, en particulier sur la terre G2. Le développement de végétaux, tant plantés qu'adventices, ne s'est produit qu'après 3 mois. Ces observations seront discutées dans le paragraphe suivant.

La première saison de végétation a eu lieu de mai à septembre 1998. Les espèces plantées n'ont pas fleuri la première année. La seconde saison de végétation a commencé début avril et s'est terminée en octobre 1999, du fait de conditions climatiques favorables. Toutes les espèces ont fleuri. La floraison a été retardée d'une semaine sur G2. La troisième saison de végétation a été suivie d'avril à juin 2000. La production de biomasse a été limitée la première année mais forte ensuite (tableau 24). Quelle que soit l'espèce et la saison de végétation, le rendement est supérieur sur G1. L'association trèfle-ray-grass est systématiquement la modalité la plus productive.

Tableau 24 : Biomasse aérienne fraîche produite par les différentes espèces végétales au cours des trois saisons de végétation (1998, 1999, 2000). Résultats exprimés en g MS par lysimètre plus ou moins l'écart-type (n=3).

Terre	Modalité	1998	1999	2000
G1	Luzerne	120 ± 38 h	971 ± 48 b	506 ± 90 def
	Ray-grass	662 ± 40 cd	688 ± 75 cd	220 ± 90 gh
	Ray-grass + trèfle	784 ± 147 bc	1644 ± 71 a	921 ± 37 b
G2	Luzerne	72 ± 17 h	531 ± 76 cde	392 ± 113 efg
	Ray-grass	190 ± 33 gh	640 ± 249 cde	275 ± 115 fgh
	Ray-grass + trèfle	167 ± 36 gh	1042 ± 315 b	385 ± 117 efg

Les valeurs affectées de lettres différentes sont significativement différentes, n=3 et p=0,05.

Les profils racinaires des espèces ont été évalués après 2,5 ans grâce à la réalisation de mini-fosses d'observation dans un tiers des lysimètres. Sur les lysimètres de terre G1, la colonisation racinaire a affecté l'ensemble du profil avec des densités racinaires encore relativement élevées en profondeur, en particulier en présence de trèfle et/ou de ray-grass. Sur la terre G2, en dehors des lysimètres plantés en luzerne, la colonisation racinaire a également affecté tout le profil, bien que la densité totale des racines soit inférieure à celle présente pour la terre G1. Le système racinaire de la luzerne a été totalement modifié en présence de terre d'ancienne usine à gaz G2. Normalement, le système racinaire d'un pied de luzerne se compose d'un fort pivot central très profond et peu ramifié latéralement. Ce type d'architecture est rencontré pour la terre G1. Pour la terre G2, le pivot est très court (2 cm) puis se ramifie de nombreuses fois, chaque ramification étant couverte d'une multitude de ramification secondaires.

Des signes de phytotoxicité dus à la terre d'ancienne usine à gaz sont observés tant au niveau du rendement aérien que de la masse racinaire. Ces résultats confirment ceux obtenus lors des tests de phytotoxicité conduits au laboratoire et décrits dans le chapitre 1. L'étude des paramètres liés à la percolation de l'eau dans les lysimètres, a permis de cerner les raisons de cette phytotoxicité ainsi que ses conséquences sur le traitement des terres.

4.4.2. Lixiviats

4.4.2.1. Phytotoxicité

Le pH des lixiviats prélevés et l'évolution de leur phytotoxicité ont été mesurés. Le pH (figure 60) et la phytotoxicité des lixiviats sur la germination du trèfle violet (figure 61) présentent trois phases d'évolution. Les deux mois qui ont suivi la mise en place du dispositif, le pH des lixiviats de G2 est très élevé et un lessivage intense de calcium est observé. Parallèlement, la phytotoxicité des lixiviats augmente d'environ 10%. Le pH des lixiviats de G1 augmente légèrement, de même que leur phytotoxicité. Après 2 mois, ce qui correspond à la date de semis, et jusqu'à la fin de la première saison de végétation, le pH des lixiviats diminue progressivement. Pour G1, le pH passe de 12,5 à 8 pour les modalités ray-grass-trèfle, luzerne et sol nu. La baisse de pH sous ray-grass est significativement plus faible et en fin de 1^{ère} période de végétation, le pH augmente de nouveau de 9 à 10,8. La phytotoxicité de ces lixiviats évolue parallèlement. La phytotoxicité des lixiviats de G2 sous ray-grass (35%) est significativement plus élevée que celle des autres modalités (20%). Après 1998, le pH des lixiviats de G2 diminue et celui des lixiviats de G1 augmente légèrement jusqu'à atteindre un

équilibre en cours de seconde saison de végétation (pH=7,5-8). La phytotoxicité évolue parallèlement et devient nulle après 1998.

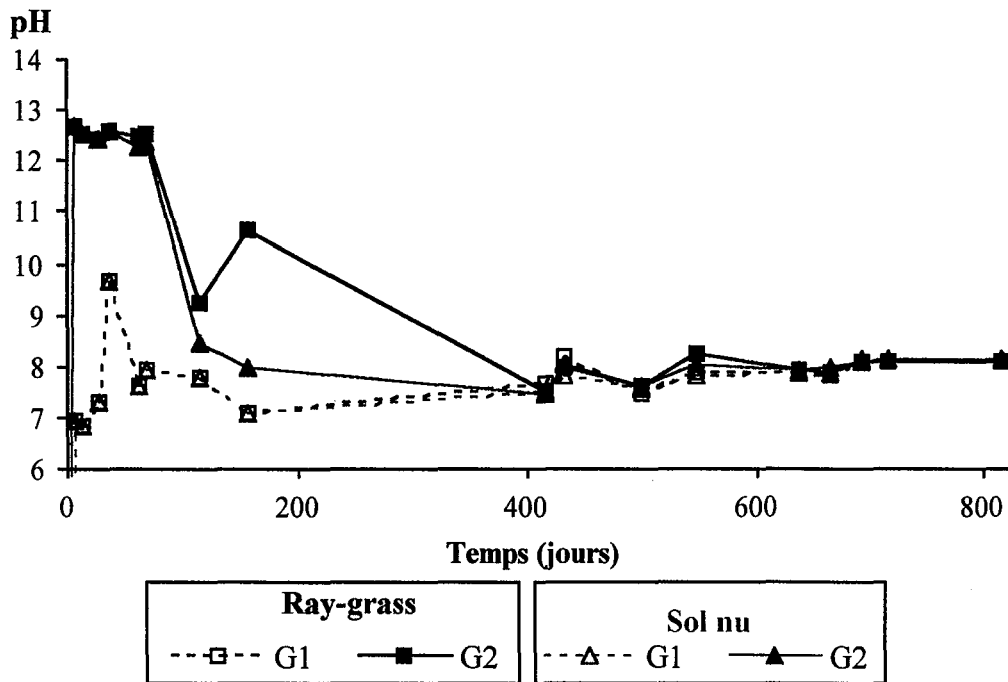


Figure 60 : Evolution du pH des lixiviats des terres d'AUG G1 (1600 mg HAP kg⁻¹ terre) et G2 (3500 mg HAP kg⁻¹ terre) en présence ou absence de plante, en dispositif de lysimètres. Les valeurs de pH pour les lixiviats des terres plantées en ray-grass+trèfle et en luzerne se situent entre les valeurs présentées. Les écart-types sont inférieurs à la taille des marques.

Une partie de la toxicité observée sur G2 est vraisemblablement consécutive au chaulage réalisé sur cette terre. En effet, suite au lessivage de la chaux observé pendant 4 mois, la phytotoxicité a diminué parallèlement au pH. Le pH de la terre de surface présente une évolution parallèle à celle des lixiviats. Ainsi, dès que le pH des lixiviats, et celui de la terre, a atteint une valeur inférieure à 10, des plantes, en particulier les espèces situées autour du site d'implantation, ont commencé à coloniser les lysimètres. Cette observation montre par conséquent que le pH était effectivement en partie responsable de la très forte phytotoxicité observée.

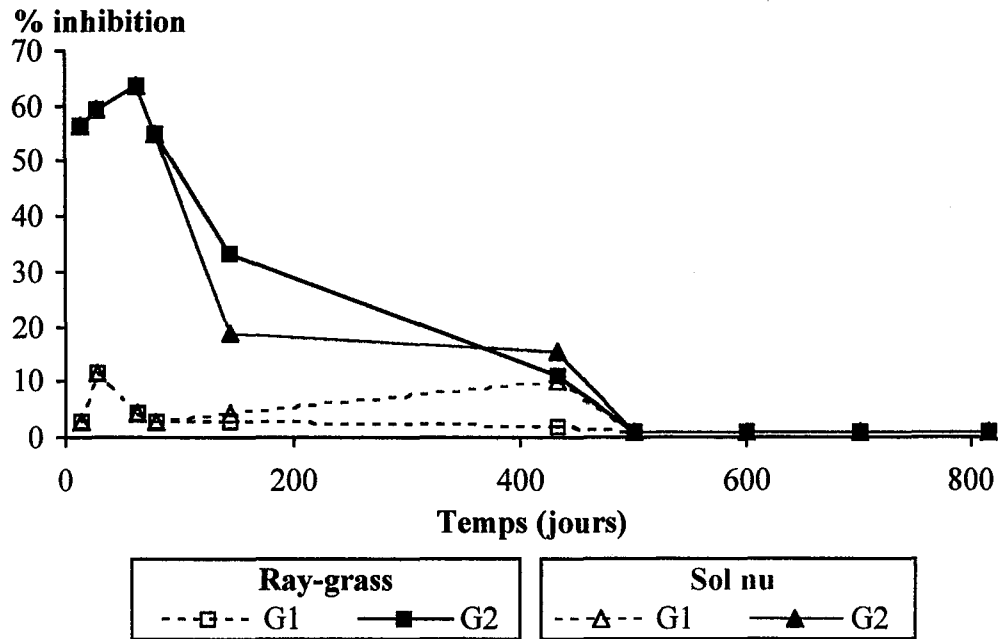


Figure 61 : Inhibition de la germination du trèfle violet par les lixiviats des terres d'AUG G1 (1600 mg HAP kg⁻¹ terre) et G2 (3500 mg HAP kg⁻¹ terre), plantées en ray-grass ou non plantées.

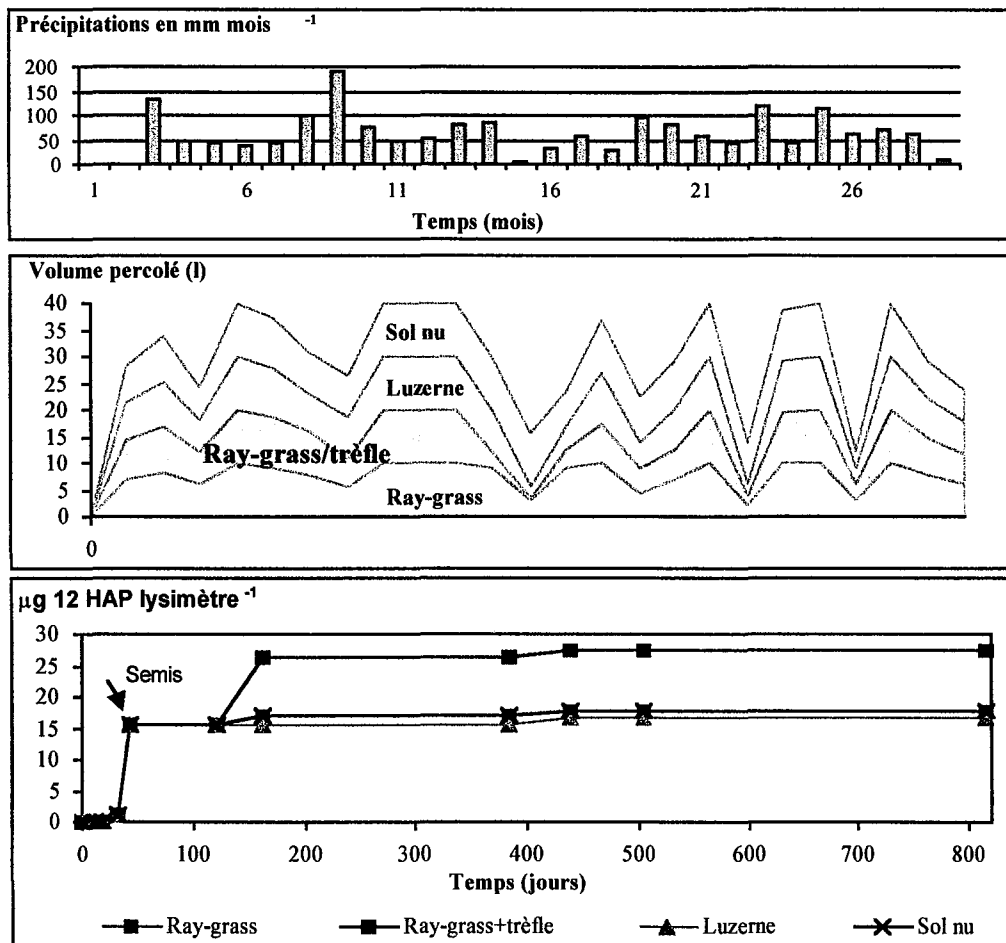
Les lixiviats de G2 ont présenté une forte odeur d'hydrocarbures pendant plusieurs mois. Cette observation indique la présence de molécules volatiles, qui ont été en partie lessivées. Or ces molécules sont phytotoxiques (cf chapitre 1). La présence d'odeurs d'hydrocarbures est détectée au niveau de la terre G2 pendant toute la durée de l'expérience. Il est ainsi possible que la présence de ces molécules volatiles explique également les signes de phytotoxicité qui ont été mis en évidence sur les espèces se développant sur la terre G2. Les molécules volatiles, en particulier les hydrocarbures mono-aromatiques inhibent les échanges gazeux et hydriques des plantes avec le sol. Or ces échanges déterminent le niveau nutritif de la plante. Les diminutions de rendements observées et le retard de la floraison pourraient donc résulter de cette baisse du niveau de nutrition de la plante.

Les terres d'anciennes usines à gaz, brutes d'excavation, sont des matériaux qui peuvent être phytotoxiques. Dans l'optique d'un phytotraitement, certaines devront vraisemblablement être prétraitées, afin de pouvoir par la suite accueillir des végétaux. Ce prétraitement pourrait se faire directement sur le dispositif de cellules de phytotraitement, comme le montrent les résultats de l'action des conditions pédoclimatiques durant les 4 premiers mois de notre expérience. Le prétraitement pourrait être aussi physico-chimique (lavage,...) et préalable au remplissage des cellules, afin d'en accélérer les délais.

Parallèlement à l'évolution des paramètres physico-chimiques et de phytotoxicité, nous avons suivi au cours de nos prélèvements successifs la teneur en HAP et le cumul des exportations de HAP dans les eaux de percolation.

4.3.2.2. HAP exportés au cours de la percolation d'eau dans les lysimètres

Au cours du suivi, les douze HAP les plus légers ont été détectés dans les lixiviats, avec des concentrations comprises entre 0,1 et 27,4 $\mu\text{g l}^{-1}$. Après une période de pluie de longue durée, composée d'épisodes de forte intensité, la concentration des HAP de poids moléculaire élevé excède leur solubilité dans l'eau. Les exportations de HAP sont calculées à partir des concentrations analysées et des volumes percolés. Le profil d'exportation comporte quatre



périodes (figures 62 et 63).

Figure 62 : Pluviométrie, volume d'eau percolé et quantité moyenne cumulée de 12 HAP exportés à partir des lysimètres de terre d'ancienne usine à gaz G1(1600 mg HAP kg⁻¹ terre) au cours des 2,5 ans du traitement.

Pendant les 2 premiers mois, le cumul des 16 HAP exportés s'élève à 15 $\mu\text{g lysimètre}^{-1}$ pour G1 et 70 $\mu\text{g lysimètre}^{-1}$ pour G2. Ces valeurs représentent entre 50 et 60% du cumul total sur 2,5 ans. Cette période est suivie d'un arrêt des exportations pendant l'été, puis d'une seconde phase d'exportation en fin de 1^{ère} saison de végétation. Au cours de cette phase, pour G1, la quantité exportée sous ray-grass (12 μg environ) est significativement supérieure à celle des autres modalités (2 μg environ).

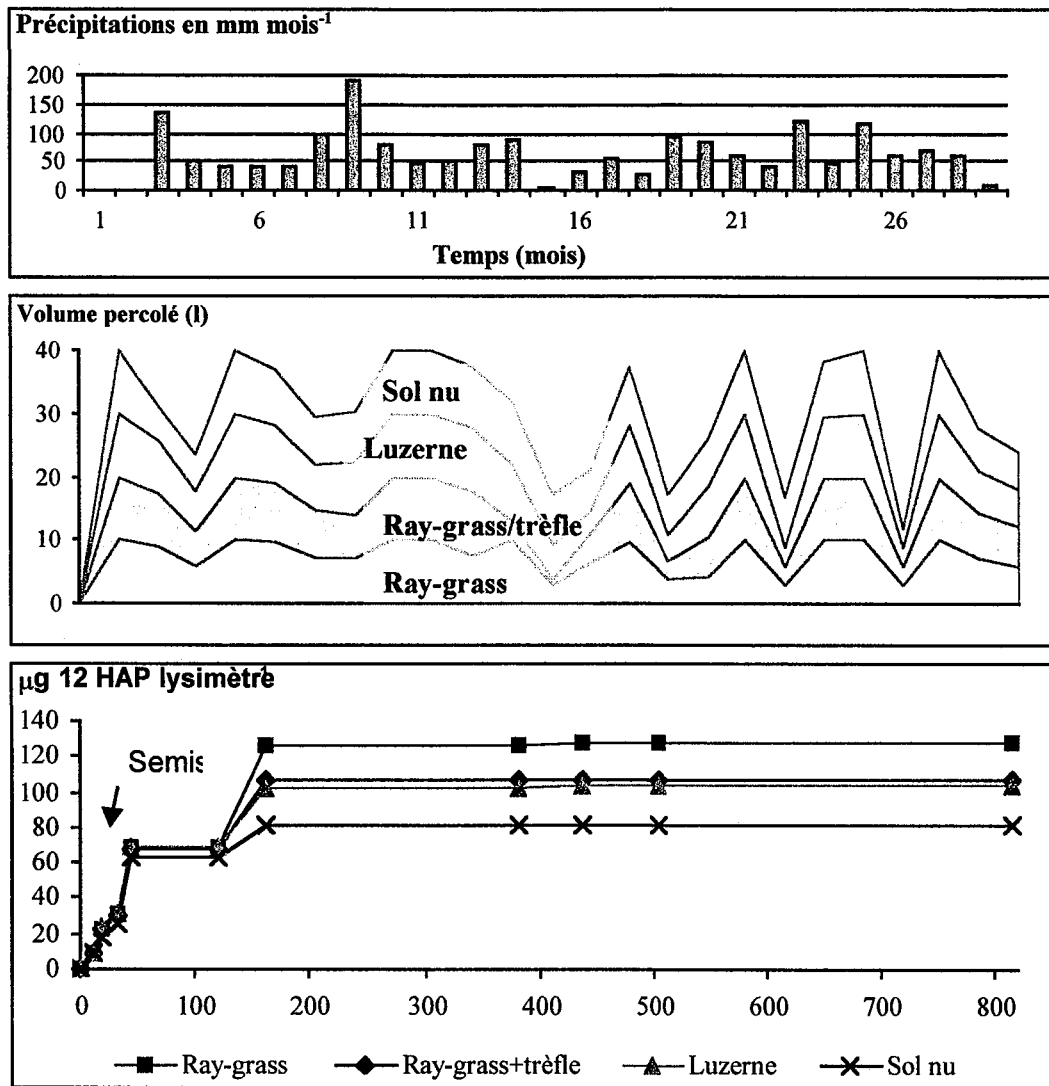


Figure 63 : Pluviométrie, volume d'eau percolé et quantité moyenne cumulée de 12 HAP exportés à partir des lysimètres de terre d'ancienne usine à gaz G2 (3500 mg HAP kg⁻¹ terre) au cours des 2,5 ans du traitement.

Pour G2, l'exportation est significativement supérieure pour l'ensemble des modalités plantées par rapport au sol nu. Les exportations sont de l'ordre de 60 μg sous ray-grass, 45 μg sous ray-grass-trèfle, 40 μg sous luzerne et 18 μg sous sol nu. Après cette période, l'ensemble des

modalités se comporte de manière équivalente. Aucun HAP n'est détecté dans l'ensemble des lixiviats à l'exception de la fin de seconde saison de végétation ou une faible exportation ($< 2 \mu\text{g}$) est observée sous les lysimètres de terre G1.

La présence de HAP dans les lixiviats découle vraisemblablement de deux facteurs : la manutention des terres d'une part, comprenant les opérations d'excavation et le chaulage de G2, et la présence de plantes d'autre part, puisque la quantité de HAP exportée dépend de la modalité de traitement.

Lors des opérations de manutention des terres (prélèvement, homogénéisation,...), la surface de contact entre les HAP piégés dans la matrice sol-goudron et l'eau qui y circule a été augmentée, ainsi que la macroporosité où circulent l'eau et les espèces dissoutes.

Parmi ces espèces, on peut trouver des matières organiques, référencées sous le terme générique de matière organique dissoute ou MOD. Ces MOD présentent une forte affinité pour les HAP, ceux de plus fort poids moléculaire en particulier. Elle est de plus particulièrement mobile dans la macro-porosité des profils de sol.

La production de MOD découle de la décondensation des matières humiques (Eschenbach *et al*, 1998). Cette décondensation peut avoir lieu à la suite d'un apport de chaux. L'apport de chaux dans la terre G2 avait été réalisé dans ce but, afin d'augmenter la surface de contact et donc l'efficacité du traitement par désorption thermique.

Au niveau des lysimètres, on peut présumer que de la MOD s'est formée suite à l'apport de chaux. Avant que le système ne se soit équilibré du point de vue de sa structure, notamment à la suite du tassement de la terre, la porosité du matériau est relativement élevée. La percolation de l'eau dans le profil à l'occasion des nombreux épisodes pluvieux ayant eu lieu pendant les 2 mois suivants la mise en place de l'expérience, est par conséquent facilitée et rapide. Cette succession d'évènements expliquerait ainsi 1) le pic d'exportation de HAP enregistré en début d'expérience et 2) que les HAP les plus lipophiles, ceux qui ont le plus d'affinité pour les matières organiques du sol, soient présents en quantités supérieures à celles que leur solubilité dans l'eau leur permettrait. L'exportation sous G2 est 5 fois plus importante que sous G1 qui n'a pas été chaulée, ce qui tend à confirmer ces hypothèses. Les observations que nous avons conduites sur la présence de HAP dans les lixiviats ainsi que les interprétations faites sont par ailleurs en accord avec les travaux de Marschner *et al*. (1999) sur le transport de HAP sous forme adsorbée.

Une seconde phase de lessivage est enregistrée au cours de la première saison de végétation. Les systèmes plantés, en ray-grass en particulier exportent plus que les témoins. Le lessivage

serait en partie dû à un effet plante. Toutefois, les modalités d'action n'ont pas été élucidées et cet effet n'est plus visible au delà de la première année, alors que l'effet plante, en particulier l'exsudation, augmente potentiellement.

L'absence de lessivage constatée après 6 mois, ainsi que les observations conduites sur les terres, peuvent être d'autre part interprétées comme la mise en place d'un équilibre dans le système, indépendamment de la présence de plantes. Le devenir des HAP dans les terres a été ensuite examiné, afin d'en analyser l'évolution en parallèle.

4.4.3. Devenir des HAP dans les terres d'ancienne usine à gaz

Les HAP des terres G1 et G2 présentent des comportements semblables pour l'ensemble des HAP. Suivant les molécules, on observe trois types d'évolution (figures 64 à 66). La teneur en HAP extractibles de quatre cycles et moins diminue significativement au cours de la première saison de végétation (figure 64). Au delà, il n'y a pratiquement plus d'évolution. Aucune différence significative n'est mise en évidence entre les modalités.

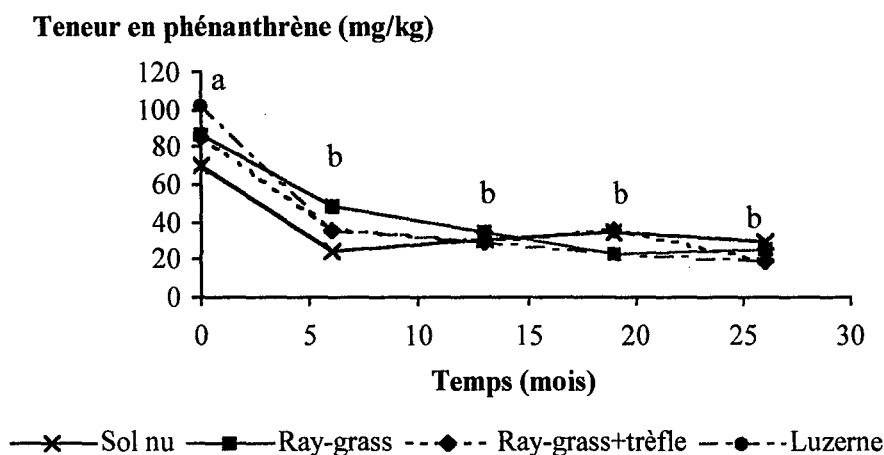


Figure 64 : Evolution de la teneur en phénanthrène extractible, représentatif des HAP de quatre cycles et moins, au cours du temps selon les modalités de traitement des lysimètres. Lettres : analyse de variance, n=3 et p=0,05, toutes modalités confondues.

La teneur en HAP extractibles de cinq cycles autre que le dibenz[a,h]anthracène n'évolue pas pendant 2,5 ans (figure 65). Aucune différence significative n'apparaît entre les modalités.

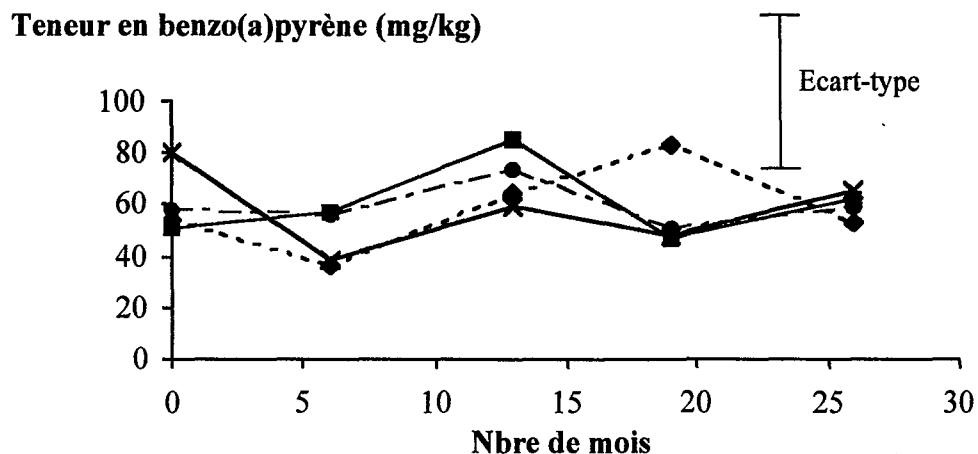


Figure 65 : Evolution de la teneur en benzo[a]pyrène extractible, représentatif des HAP de cinq cycles au cours du temps selon les modalités de traitement des lysimètres.

Certains HAP se comportent de manière particulière (figure 66). La teneur des terres en naphtalène augmente significativement au début de la troisième saison de végétation. La teneur des terres en fluorène (3 cycles) augmente significativement en sortie du premier hiver (1998-1999) puis diminue progressivement ensuite. La teneur des terres en acénaphène (3 cycles), dibenz[ah]anthracène (5 cycles) et benzo[ghi]pérylène (6 cycles) n'évolue pas au cours de la première saison de végétation, augmente significativement pendant l'hiver 1998-1999, n'évolue pas au cours de la seconde saison de végétation, puis diminue significativement pendant l'hiver 1999-2000. Aucune différence significative n'est mise en évidence entre les modalités.

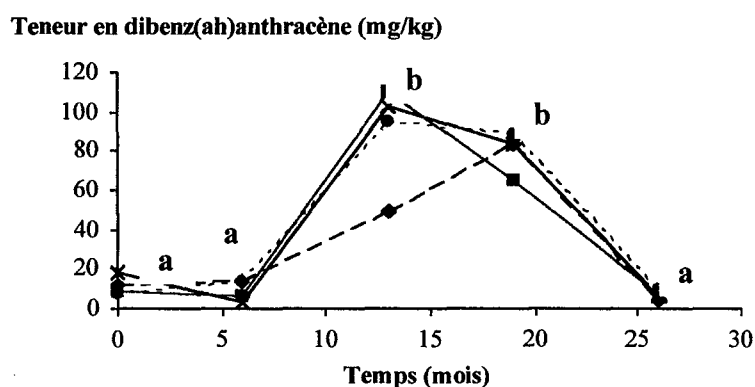


Figure 66 : Evolution de la teneur en dibenz[a,h]anthracène extractible, représentatif du troisième type de comportement présenté par les 16 HAP au cours du temps selon les modalités de traitement des lysimètres. Lettres : analyse de variance toutes modalités confondues, n=3 et p=0,05.

Pour la plupart des HAP, les quantités totales extraites pour les deux terres en fin de traitement sont du même ordre de grandeur, bien que les teneurs extraites, d'un point de vue qualitatif, au temps 0 soient totalement différentes. Le tableau 25 résume les teneurs moyennes en 16 HAP des terres G1 et G2 en début et fin d'essai.

Si une diminution de la teneur en HAP des terres est enregistrée, aucun paramètre ne nous permet d'expliquer clairement les modalités de cette évolution : biodégradation, volatilisation ou passage vers un état non extractible.

L'intensité moyenne de la dissipation est élevée. Il existe cependant de bonnes corrélations entre les taux de dissipation apparents enregistrés et l'affinité des matières organiques du sol pour les molécules considérées, affinité caractérisée par le log Koc. ($r^2 = 0,753$ pour G1 et $r^2 = 0,705$ pour G2).

Tableau 25: Teneur en HAP (mg kg^{-1}) des terres des lysimètres en début et fin de traitement.

	Terre G1		Terre G2	
	Début essai	Fin essai	Début essai	Fin essai
Naphtalène	18,9 ± 6,0	5,2 ± 0,6	20,4 ± 3,4	5,3 ± 1,5
Acénaphthylène	11,3 ± 3,6	1,4 ± 0,2	28,9 ± 3,4	1,1 ± 1,2
Acénaphthène	10,1 ± 1,1	2,9 ± 1,4	22,8 ± 2,6	0,2 ± 0,4
Fluorène	27,5 ± 16,5	4,4 ± 1,2	85,1 ± 38,1	4,8 ± 0,9
Phénanthrène	86,2 ± 13,0	23,2 ± 5,0	280,9 ± 24,7	17,5 ± 2,0
Anthracène	29,5 ± 3,1	11,3 ± 2,1	97,4 ± 6,7	13,9 ± 3,1
Fluoranthène	148,1 ± 13,7	82,3 ± 11,4	237,3 ± 26,5	82,0 ± 6,7
Pyrène	127,7 ± 5,6	56,6 ± 7,9	188,1 ± 20,9	64,6 ± 8,0
Benzo[a]anthracène	70,8 ± 2,6	37,5 ± 4,8	101,5 ± 6,6	32,9 ± 11,6
Chrysène	55,0 ± 7,7	35,4 ± 3,9	78,7 ± 9,0	42,2 ± 4,5
Benzo[b]fluoranthène	65,5 ± 10,4	47,7 ± 4,4	75,8 ± 6,5	62,8 ± 4,5
Benzo[k]fluoranthène	53,1 ± 11,2	47,7 ± 5,8	65,7 ± 8,0	67,5 ± 6,1
Benzo[a]pyrène	61,0 ± 13,4	59,9 ± 5,1	65,3 ± 8,9	83,9 ± 6,1
Indéno[123-cd]pyrène	31,7 ± 8,4	26,0 ± 5,1	28,9 ± 3,6	28,6 ± 2,4
Benzo[ghi]pérylène	34,0 ± 8,2	0,4 ± 3,5	32,5 ± 9,3	41,1 ± 6,5
Dibenz[ah]anthracène	11,7 ± 4,5	7,1 ± 2,2	13,4 ± 6,6	7,4 ± 1,6
TOTAL	842,1 ± 129,0	449,0 ± 64,6	1422,7 ± 184,8	555,8 ± 67,1

* Dissipation

Durant les 6 premiers mois de l'expérience, l'intensité de la dissipation, qui est calculée à partir de la fraction extractible au solvant, est élevée. Ce résultat semble donc en désaccord apparent avec ceux obtenus sur la terre d'AUG en conditions contrôlées pendant 6 mois. L'intensité de la dissipation diminue quand le poids de la molécule et le coefficient K_{oc} , mesurant l'affinité de la molécule pour les matières organiques, augmentent ce qui, à la variabilité due aux différences chimiques des molécules près, correspond à un poids moléculaire croissant. Cette corrélation suggère, par rapport au modèle tri-compartimental, que la dissipation enregistrée correspond à la désorption/dissipation progressive d'une fraction mobilisable, bien que l'on ait précédemment émis comme hypothèse que le carbone (HAP) dans les terres d'AUG était stable, du moins sur 6 mois. Comme les terres utilisées pour les lysimètres ne sont pas différentes de celles utilisées lors des tests en vases de végétation, il semble donc qu'en conditions naturelles et avant que la plante ait un réel effet, des HAP aient été mobilisables ou soient devenus mobilisables, sans qu'alors la cause en soit entrevue.

Afin d'affiner ces résultats, et bien qu'aucun effet plante n'ait été mis en évidence à quelque moment que ce soit, il serait donc intéressant de caractériser les différents compartiments de carbone présents dans le dispositif (stock dû aux goudrons, stock dû à la plante sous forme d'exsudats) et leur évolution (degré d'humification, réactivité,...) au cours du temps.

* Hétérogénéité du matériau

L'hétérogénéité des matériaux employés pour le dispositif pilote est grande car les terres ont été utilisées brutes d'excavation. Cette hétérogénéité se traduit par des écart-types importants sur les dosages des teneurs en HAP. En conséquence, si les effets que l'on cherchait à mettre en évidence, en particulier l'effet plante, n'excèdent pas cette variabilité intrinsèque, globalement ils ne seront pas mis en évidence.

La multiplication des répétitions ou l'utilisation de dispositifs de petite taille, dans lesquels le matériau a été homogénéisé, n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet significatif de la présence de plante, ni de diminuer la variabilité dans les analyses. Cette variabilité n'est pas due au protocole analytique puisque celui-ci a été validé, mais à la nature de la contamination des terres d'ancienne usine à gaz.

Celle-ci n'est pas homogène dans le sol mais est principalement véhiculée par de multiples pépites goudronneuses. Ainsi, lors de la constitution des échantillons à analyser, la présence

d'une pépite en plus ou en moins peut avoir de grandes conséquences sur l'analyse finale. Certaines pépites sont en effet suspectées pouvoir contenir des HAP pratiquement purs (Blumer, 1975).

Malheureusement on ne peut s'affranchir de cette variabilité car on ne peut ni multiplier les répétitions, car alors on limite le nombre de modalités pouvant être testées, ni augmenter la taille des échantillons à l'infini, car le coût d'analyse devient prohibitif. Une alternative à ce problème est donc l'emploi de systèmes artificiellement contaminés, et artificiellement vieillis si nécessaire. Dans ces systèmes, la contamination de départ est connue et l'hétérogénéité limitée.

* Temps d'expérience et équilibres entre compartiments

L'opposition des résultats obtenus sur le terrain (30 ans) et en laboratoire (6-30 mois) conduit à envisager l'influence du temps sur les processus de dégradation/dissipation, c'est à dire par conséquent sur les équilibres de notre modèle tri-compartimental conduisant au passage des HAP d'un état stable vers un état disponible. La question qui se pose est de savoir si l'effet éventuel de la plante ne se fait alors qu'à plus long terme, par la somme d'effets non mis en évidence à l'échelle d'une ou deux saisons de végétation. En effet, les processus d'évolution des matières organiques, de l'humification, sont des processus lents. Des expériences de longue durée doivent donc être envisagées dans ce sens, de manière à caractériser l'évolution de la teneur en HAP au cours du temps en système planté ou non. Rien ne garantit, en effet, qu'un système qui a évolué pendant 20 ans et qui est "apparemment" stable sur des temps d'étude courts, n'évolue pas lentement pendant les 10 années suivantes. De telles expériences, par leur contribution à la compréhension des interactions sol-plante-polluant, pourraient déboucher sur l'identification de facteurs clés de l'évolution des HAP dans le sol, donc potentiellement sur des outils permettant de stimuler cette évolution. Dans ce cadre, l'utilisation de systèmes artificiellement contaminés devra être envisagée, afin de simplifier le système.

5. CONCLUSIONS

Ce chapitre a présenté les résultats obtenus lors d'expériences de dissipation des HAP d'un sol en conditions naturelles et en conditions contrôlées. Les résultats ont été interprétés grâce à un modèle dans lesquels les HAP se répartissent dans 3 compartiments en interaction, de biodisponibilité décroissante : la phase aqueuse, la phase adsorbée mobilisable et la phase adsorbée résistante.

Suite à un apport de HAP purs dans une terre agricole, une diminution rapide (20 jours) puis lente de la teneur de la terre en HAP extractibles est observée en conditions contrôlées sur 6 mois. Cette diminution peut être expliquée par la dissipation des HAP qui n'ont pas migré vers la fraction résistante du polluant, fraction qui a pu être mise en évidence après déstructuration des matières organiques. Dans la terre d'AUG utilisée dans les mêmes conditions, aucune diminution n'est observée. Les HAP seraient donc dans ce cas présents sous forme stable (sur 6 mois). Toutefois, les expériences conduites en colonnes de sol et en dispositif pilote de lysimètres affinent ces résultats et suggèrent que la fraction de HAP considérée comme stable pourrait être constituée en réalité d'un ensemble de sous compartiments plus ou moins résistants, et dont certains seraient mobilisables dans certaines conditions.

Que ce soit sur le court ou le long terme et en conditions naturelles ou contrôlées, malgré une optimisation des conditions, aucun effet plante n'a été mis évidence, à part sur la teneur en HAP des niveaux de profondeur sur un dispositif de colonnes de sol. Ce résultat concerne les HAP peu biodisponibles des terres d'ancienne usine à gaz comme les HAP apportés purs dans une terre agricole.

Au niveau du dispositif pilote, il semble par ailleurs que, dans certaines conditions, la présence de plantes entraîne le transport de HAP par les eaux de percolation avec des concentrations supérieures aux systèmes non plantés.

En résumé, nos résultats montrent que dans les conditions testées, la rhizosphère ne semble pas efficace pour dissiper et/ou dégrader les HAP de manière mesurable. Si une forte diminution de la teneur en HAP a été enregistrée sur un délai satisfaisant pour un biotraitement (6 mois), les mécanismes n'en ont pas été élucidés et la plante n'a présenté aucun effet notable sur toute la durée de l'expérience. Au delà de la simple recherche d'une méthode efficace de traitement applicable aux terres d'ancienne usine à gaz, nos travaux appellent donc de nombreuses expériences complémentaires visant à caractériser la dynamique des polluants dans le système sol-plante.

Conclusion générale

L'utilisation des végétaux et de leur microflore associée, ou phytoremédiation, a été depuis longtemps étudiée pour le traitement des terres contaminées par les métaux ou par les composés organiques. Des études récentes, comme celle d'Aprill & Sims (1990), conduites sur divers produits organiques dont les HAP, ont contribué à souligner l'intérêt de l'utilisation de plantes pour stimuler les processus de biodégradation dans la rhizosphère.

Ainsi, le présent travail a été réalisé afin d'étudier la possibilité d'utiliser la phytoremédiation pour dépolluer des terres de friche industrielle contaminées par des HAP. Au cours de ces études, nous avons essayé de mettre en parallèle les renseignements apportés par l'utilisation de systèmes simplifiés, contaminés par des produits purs, et ceux obtenus avec les terres d'ancienne usine à gaz, constituant une pollution complexe. Nous avons par ailleurs travaillé à différentes échelles, de la boîte de Pétri jusqu'à la micro-parcelle (dispositif pilote). De cette manière, nous sommes passés progressivement d'un essai d'acquisition de connaissances fondamentales, à l'application pratique en conditions représentatives de celles du terrain. Outre la variété des matériaux employés (la terre, le goudron, les produits purs) et la variété des dispositifs, nous avons de plus introduit une variabilité au niveau du temps. Nos expériences ont ainsi été conduites à l'aide de tests d'une durée inférieure à un mois, pour l'étude des paramètres caractérisant la croissance des végétaux, ainsi que de tests allant de 6 mois à 2,5 ans pour l'étude des processus de phytodégradation.

La première partie de ce travail a permis de préciser les relations entre la présence d'une contamination et le développement des végétaux. Nos premières observations montrent que les végétaux, tant cultivés que sauvages, tolèrent des niveaux relativement élevés de contamination. Ces résultats sont en accord avec l'identification d'une flore nombreuse et variée dans des zones parfois très contaminées des sites d'anciennes usines à gaz. Cette tolérance conduit à l'implantation et au développement jusqu'à maturité de nombreuses espèces.

Toutefois, il apparaît que le développement racinaire et aérien de la majorité de ces espèces est perturbé en présence des terres d'anciennes usines à gaz excavées de profondeur, ainsi que de goudrons. Les tests de développement du végétal conduits en laboratoire montrent que cette phytotoxicité est due à des molécules volatiles de type BTX en particulier et non aux HAP, qui, à l'exception du naphtalène, ne sont pas phytotoxiques.

Les processus de vieillissement du sol, conduisant à la dégradation et/ou au lessivage de molécules volatiles toxiques, permettent de lever la phytotoxicité des terres. On explique ainsi, que sur les sites d'anciennes usines à gaz, la flore se développe même en présence de goudrons quasi purs, sans laisser paraître de signes visibles de phytotoxicité. Si ces processus, inclus sous le terme d'atténuation naturelle ou de «vieillissement», expliquent la colonisation des sites par la flore ubiquiste des champs, forêts et talus, il est vraisemblable que l'implantation de végétaux pour traiter les terres excavées chargées en produits volatils doive passer par une phase de prétraitement pour diminuer leur phytotoxicité.

D'autre part, l'étude du développement racinaire en fonction de la contamination en HAP des terres et de sa localisation montre une modification de l'architecture de la plante. En effet bien que la construction du système racinaire ne soit pas anarchique, la morphologie des racines, leur très faible diamètre en particulier, laisse penser qu'il s'agit d'un effet soit de phytotoxicité, soit d'une stimulation du développement induite par des modifications vraisemblablement au niveau de la balance entre hormones végétales. Parallèlement, si la masse racinaire produite augmente, la biomasse aérienne diminue en présence de terre d'AUG. Ces observations montrent que le fonctionnement de la plante est modifié sur ces terres, puisque vraisemblablement, la majorité de l'énergie et des assimilats produits par la plante sont utilisés pour l'édification du système racinaire au détriment des feuilles. Cependant, à ce stade des recherches, nous ne pouvons indiquer quelles sont les raisons de ces modifications morphologiques et leurs conséquences physiologiques sur l'activité de la racine, tant en présence qu'en absence de HAP.

Cette étude a aussi permis de montrer que les racines « évitent » les zones très contaminées au profit des zones peu ou pas contaminées. Comme nous ne pouvons relier cette observation à une différence des propriétés structurales des terres, il est vraisemblable que cet évitement constitue une réaction spécifique aux matériaux contaminés. Cette observation est apparemment en désaccord apparent avec ce que l'on peut observer sur site, car des racines se développant dans des couches goudronneuses, voire dans du goudron pur, y ont été observées. Nous n'avons toutefois pas pu caractériser les systèmes racinaires des espèces présentes. En effet, l'hétérogénéité des matériaux constituant les sols des sites est un facteur suffisant pour induire une prolifération des racines, sans que la toxicité des matériaux soit mise en jeu.

Ces études sur le développement des végétaux nous ont conduit à utiliser des critères agronomiques, plutôt que des critères liés au niveau de tolérance à la contamination, pour le choix des espèces à implanter lors de la mise en place d'un traitement des terres par phytoremédiation. Les principaux critères retenus ont été la rusticité et la pérennité, la densité

et la profondeur maximale atteinte par le système racinaire, afin d'assurer la colonisation maximum des terres et de limiter les coûts de l'itinéraire technique. Ces critères nous ont donc conduits à sélectionner des graminées rustiques, ainsi que des légumineuses, pour leur faibles exigences notamment en termes de fertilisants.

Ces espèces, les graminées en particulier, ont été utilisées pour étudier le devenir des HAP dans le système sol-plante. Nos travaux ont permis de montrer que la phytoextraction est un phénomène négligeable, en particulier à partir du sol, par rapport au niveau de contamination du substrat. Etant donné que la plante extrait peu de HAP et que ceux-ci, une fois transférés sont, au vu des données bibliographiques, soit métabolisés soit incorporés dans les tissus après modification, il pourrait être envisagé d'utiliser la masse végétale produite comme apport de matière organique au sol, afin d'alimenter le processus d'humification et le niveau de fertilité des terres.

L'évolution de la teneur en HAP des terres, lors des études de dissipation conduites tant en vases de végétation qu'en système pilote, peut être modélisée en considérant que les HAP sont présents dans les terres dans trois compartiments : un compartiment contenant des HAP labiles, rapidement dissipés, un compartiment contenant des HAP peu disponibles et un compartiment contenant des HAP non extractibles. Les HAP évoluent ainsi selon les mêmes processus que l'ensemble des matières organiques du sol, d'un état disponible vers un état non disponible. Les résultats obtenus avec des produits purs illustrent parfaitement ce schéma à trois compartiments et les équilibres qui s'instaurent entre eux. Nous avons ainsi mis en évidence une phase de diminution rapide de la teneur en HAP, assimilée à la dissipation de la fraction disponible, suivie d'une phase lente de dissipation, assimilée à la désorption suivie de dissipation d'une fraction ayant migré dans des sites peu accessibles au sein des constituants du sol. La fraction de HAP résiduelle contient ainsi pour partie des HAP peu disponibles et pour partie des HAP incorporés aux matières organiques.

Au niveau de la terre d'AUG, l'absence d'évolution de la teneur en HAP constatée au cours de 6 mois d'expérience, laisse penser que les HAP présents ne sont pas disponibles ni extractibles. En conditions non limitantes pour le développement des racines, toutefois, on peut observer une diminution de la teneur en HAP des terres de profondeur, en particulier en présence de plantes. Ces observations sont apparemment explicables par une modification de la réactivité des terres vis à vis des HAP en cours d'expérience. Ce résultat assez original suggère que les relations plante-cycle des matières organiques dans le sol est un facteur clé du devenir des polluants, puisque les modifications sont plus sensibles en présence de plantes.

Au niveau du dispositif pilote, placé en conditions naturelles, nous avons observé une forte diminution de la teneur en HAP des terres pendant 6 mois, ce qui est apparemment en désaccord avec les résultats obtenus en vases de végétation. Cette observation pourrait être la conséquence des opérations de manutention des terres. En effet, celles-ci ont conduit d'une part, à l'augmentation de leur porosité et, d'autre part, à une augmentation de la surface de contact sol-eau, au niveau de laquelle a lieu la désorption. Ces modifications auraient alors permis à une partie de la fraction dite « résistante » de passer dans un compartiment plus disponible. La stabilité du système après ces six mois rejoint alors les résultats obtenus pour des dispositifs optimisés.

Que ce soit en conditions optimisées et en vases de végétation de faible volume, ou en conditions de terrain, et quelle que soit la durée considérée, aucun effet mesurable de la plante sur la diminution de la teneur en HAP des terres d'AUG n'a pu être mise en évidence. Ce résultat suggère que la plante n'agit pas sur les différents compartiments du polluant dans les sols, du moins dans les délais expérimentaux utilisés. De plus, contrairement aux études existantes, nous n'avons pas pu mettre en évidence, dans nos conditions expérimentales, d'effet de la plante sur des HAP purs apportés au sol. Des études complémentaires, visant à étudier la qualité des différents stocks de matière organique dans le sol, et leur évolution permettrait peut-être d'apporter certaines réponses.

Dans le cadre plus général de la compréhension des relations plante-sol-polluant-micro-organismes, l'étude de la phytoremédiation doit être poursuivie. De plus, il n'est pas impossible que sur un pas de temps plus long, cette technique ne se révèle pas efficace pour traiter les terres contaminées par les HAP. Si nous n'avons pas pu mesurer d'effet de la plante sur la teneur en HAP, c'est que ceux-ci étaient discrets et n'excédaient pas la variabilité analytique sur l'évaluation des teneurs en HAP, due à l'hétérogénéité de la contamination des matériaux. On ne peut malheureusement pas s'affranchir de cette variabilité. Par conséquent, il est possible qu'à terme, par le cumul d'effet significatifs non mesurables, on mette en évidence un effet de la plante. Il est également probable, outre la nature du substrat, que la durée des tests ait été un facteur limitant. Il faut par conséquent envisager de poursuivre les études en dispositif pilote sur le long terme.

De nombreuses interrogations demeurent quant à la relation plante-polluant et plus finement quant à la physiologie de la plante et ses modifications éventuelles en présence de pollution. L'état de fonctionnement des plantes dont le système racinaire est modifié en présence de polluant reste en particulier à discuter.

Les questions posées ont également trait aux processus du devenir des HAP dans les terres. L'absence de données bibliographiques relatives aux HAP ou la présence de données contradictoires, nous a en effet souvent amenés à utiliser les nombreuses données existantes quant au devenir des pesticides dans le sol, en tenant évidemment compte du fait de la nature hydrophobe et stable de la molécule. Ce type de raisonnement s'est avéré en général positif. Nous avons ainsi considéré que les HAP pourraient se comporter de manière analogue aux pesticides vis à vis de la matière organique d'un sol agricole. Au niveau du sol d'ancienne usine à gaz, la matière organique est en partie constituée de macro-molécules du type résines et asphaltènes, provenant du goudron. Certaines données existantes suggèrent que ce type de matrice hydrocarbonée, dont la structure reste hypothétique, pourraient avoir un comportement proche de celui des macro-molécules humiques. Certains comportements cependant, comme l'absence de relargage des résidus liés, montrent les limites de ce raisonnement. Par conséquent, des études complémentaires seront nécessaires afin de comprendre l'influence de la plante sur les mécanismes d'humification, sur le cycle global du carbone dans le sol, sur la microflore et sa capacité à dégrader les HAP. Ces études pourraient alors déboucher sur la mise en évidence des facteurs permettant d'intervenir au niveau de ces divers processus.

Références bibliographiques

- AAMAND J., JORGENSEN C., ARVIN E., JENSEN B.K. (1989) Microbial adaptation to degradation of hydrocarbons in polluted and unpolluted groundwater. *J. Contam. Hydrol.*, **4**, 299-312.
- AFNOR, Norme expérimentale X31-201 (1982) Qualité des sols-Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance.
- AFNOR, Norme expérimentale X31-202 (1986) Qualité des sols-Essai d'inhibition de la croissance des végétaux par une substance.
- AFNOR, Norme expérimentale X31-203 (ISO 11269-1) (1994) Qualité des sols-Détermination des effets des polluants sur la flore du sol. Part 1 : Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.
- ALEXANDER R.R., ALEXANDER M. (1999) Genotoxicity of two polycyclic aromatic hydrocarbons declines as they age in soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18** (6), 1140-1143.
- ALEXANDER R.R., ALEXANDER M. (2000) Bioavailability of genotoxic compounds in soils. *Environ. Sci. Technol.*, **34**, 1589-1593.
- ALLARD A.-S., NEILSON A.H. (1997) Bioremediation of organic waste sites : a critical review of microbiological aspects. *Int. Biodeterioration Biodegradation*, **39** (4), 253-285.
- AMAKIRI J.O., ONOFEGHARA F.A. (1984) Effects of crude oil pollution on the germination of *Zea mays* and *Capsicum frutescens*. *Environ. Pollut.*, **35**, 159-167.
- ANDERSON T.A., GUTHRIE E.A., WALTON B.T. (1993) Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 2630-2636.
- 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.
- ATKINSON R., AREY J. (1992) Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons : formation of atmospheric mutagens. Symposium on Risk Assessment of Urban Air : Emissions, Exposure, Risk identification and Risk Quantitation, 31 May-3 June 1992, Stockholm, Sweden.
- ATLAS R.M. (1991) Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **52**, 149-156.
- BAKER A.J.M. (1981) Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.*, **3** (1-4), 643-654.
- BAKER A.J.M., McGRATH S.P., SIDOLI C.M.D., REEVES R.D. (1994) The possibility of *in situ* heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resour. Conserv. Recycl.*, **11**, 41-49.
- BALESDENT J., WAGNER G.H., MARIOTTI A. (1988) Soil organic matter turnover in long-term field experiments as revealed by carbon-13 natural abundance. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **52** (1), 118-124.
- BANKS M.K., LEE E., SCHWAB A.P. (1999) Evaluation of dissipation mechanisms for benzo[a]pyrene in the rhizosphere of tall fescue. *J. Environ. Qual.*, **28**, 294-298.
- BARCLAY C.D., FARQUHAR G.F., LEGGE R.L. (1995) Biodegradation and sorption of polyaromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 958-963.

- BARRIUSO E., CALVET R., SCHIAVON M., SOULAS G. (1996) Les pesticides et les polluants organiques des sols. Transformations et dissipation. *Etude et Gestion des Sols*, **3-4**, 279-296.
- BAUR P. (1997) Lognormal distribution of water permeability and organic solute mobility in plant cuticles. *Plant Cell Environ.*, **20**, 167-177.
- BAUR P., BUCHHOLZ A., SCHÖNHERR J. (1997) Diffusion in plant cuticles as affected by temperature and size of organic solutes : similarity and diversity among species. *Plant Cell Environ.*, **20**, 982-994.
- BELKIN S., STIEBER M., TIEHM A., FRIMMEL F.H., ABELIOVICH A., WERNER P., ULITZUR S. (1994) Toxicity and genotoxicity enhancement during polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.*, **9**, 303-309.
- BENOIT P., BARRIUSO E., SOULAS G. (1999) Degradation of 2,4-D, 2,4-dichlorophenol, and 4-chlorophenol in soil after sorption on humified and nonhumified organic matter. *J. Environ. Qual.*, **28**, 1127-1135.
- BEZALEL L., HADAR Y., CERNIGLIA C.E. (1996a) Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (1), 292-295.
- BEZALEL L., HADAR Y., FU P.P., FREEMAN J.P., CERNIGLIA C.E. (1996b) Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (7), 2554-2559.
- BIDAUD C., TRAN-MINH C. (1998) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation in the soil of a former gasworks site: selection and study of PAHs-degrading microorganisms. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **5**, 417-421.
- BLUM S.C., SWARBRICK R.E. (1977) Hydroponic growth of crops in solutions saturated with (14C)benzo[a]pyrene. *J. Agric. Food Chem.*, **25** (5), 1093-1096.
- BLUMER M. (1975) Cutisite, idrialite and pendletonite, polycyclic aromatic hydrocarbon minerals : their composition and origin. *Chem. Geol.*, **16**, 245-256.
- BOERSMA L., LINDSTROM F.T., MCFARLANE C., McCOY E.L. (1988) Uptake of organic chemicals by plants : a theoretical model. *Soil Sci.*, **146** (6), 403-417.
- BOERSMA L., MCFARLANE C., LINDSTROM F.T. (1991) Mathematical model of plant uptake and translocation of organic chemicals : application to experiments. *J. Environ. Qual.*, **20**, 137-146.
- BOGAN B.W., LAMAR R.T. (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular lignolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (5), 1597-1603.
- BOGAN B.W., LAMAR R.T., HAMMEL K.E. (1996a) Fluorene oxidation in vivo by *Phanerochaete chrysosporium* and in vitro during peroxidase-dependent lipid peroxidation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (5), 1788-1792.
- BOGAN B.W., SCHOENIKE B., LAMAR R.T., CULLEN D. (1996b) Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (7), 2381-2386.
- BOGAN B.W., SCHOENIKE B., LAMAR R.T., CULLEN D. (1996c) Expression of lip genes during growth in soil and oxidation of anthracene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (10), 3697-3703.

- BOLLAG J.-M. (1992) Decontaminating soil with enzymes-An in situ method using phenolic and anilinic compounds. *Environ. Sci. Technol.*, **26** (10), 1876-1881.
- BOLLAG J.-M., LOLL M.J. (1983) Incorporation of xenobiotics into soil humus. *Experientia*, **39**, 1221-1231.
- BOTTNER P., PANSU M., SALLIH Z. (1999) Modelling the effect of active roots on soil organic matter turnover. *Plant Soil*, **216**, 15-25.
- 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 156-164.
- BOYLE J.J., SHANN J.R. (1995) Biodegradation of phenol, 2,4-D, and 2,4,5-T in field-collected rhizosphere and nonrhizosphere soils. *J. Environ. Qual.*, **24**, 782-785.
- BOYLE J.J., SHANN J.R. (1998) The influence of planting and soil characteristics on mineralization of 2,4,5-T in rhizosphere soil. *J. Environ. Qual.*, **27**, 704-709.
- BRIGGS G.G., BROMILOW R.H., EVANS A.A. (1982) Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pestic. Sci.*, **13**, 495-504.
- BRIGGS G.G., BROMILOW R.H., EVANS A.A., WILLIAMS M. (1983) Relationships between lipophilicity and the distribution of non-ionised chemicals in barley shoots following uptake by the roots. *Pestic. Sci.*, **14**, 492-500.
- BROMILOW R.H., CHAMBERLAIN K., EVANS A.A. (1989) Designing molecules for systemicity. In MECHANISMS AND REGULATION OF TRANSPORT PROCESS, British Plant Growth Regulator Group, Monograph 18, 113-128.
- BROMILOW R.H., CHAMBERLAIN K., EVANS A.A. (1990) Physiochemical aspects of phloem translocation of herbicides. *Weed Sci.*, **38**, 305-314.
- BROOKS R.R., REEVES R.D., JAFFRE T. (1977) Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *J. Geochem. Explor.*, **7**, 49-57.
- BRUCKERT S., ANDREUX F., CORREA A., AMBOUTA C.J.M., SOUCHIER B. (1978) Fractionnement des agrégats appliqué à l'analyse des complexes organo-minéraux des sols. *Note Technique n°22*, Centre de Pédologie Biologique. CNRS, Nancy.
- BRYSELBOUT C., HENNER P., LICHTFOUSE E. (1999) Fossil fuel biomarkers in plant waxes as pollution parameters. *Sci. Tot. Environ.*, **222**, 201-204.
- BRYSELBOUT C., HENNER P., CARSIGNOL J., LICHTFOUSE E. (2000) Polycyclic aromatic hydrocarbons in highway plants and soils. Evidence for a local distillation effect. *Analysis*, **28** (4), 32-35.
- BÜCKER M., GLATT H.R., PLATT K.L., AVNIR D., ITTAH Y., BLUM J., OESCH F. (1979) Mutagenicity of phenanthrene and phenanthrene K-region derivatives. *Mutat. Res.*, **66**, 337-348.
- BURFORD M.D., HAWTHORNE S.B., MILLER D.J. (1993) Extraction rates of spiked versus native PAHs from heterogeneous environmental samples using supercritical fluid extraction and sonication in methylene chloride. *Anal. Chem.*, **65**, 1497-1505.
- CALDINI G., CENCI G., MANENTI R., MOROZZI G. (1995) The ability of an environmental isolate of *Pseudomonas fluorescens* to utilize chrysene and other four-ring polynuclear aromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 225-229.

- CASILLAS R.P., CROW Jr S.A., HEINZE T.M., DECK J., CERNIGLIA C.E. (1996) Initial oxidative and subsequent conjugative metabolites produced during the metabolism of phenanthrene by fungi. *J. Ind. Microbiol.*, **16**, 205-215.
- CENCI G., CALDINI G. (1997) Catechol dioxygenase expression in a *Pseudomonas fluorescens* strain exposed to different aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 306-308.
- CERNIGLIA C.E. (1997) Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons : past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 324-333.
- CERNIGLIA C.E., HEITKAMP M.A. (1989) Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In METABOLISM OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN THE AQUATIC ENVIRONMENT, Varanasi U. Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 41-68.
- CHAÎNEAU C.-H. (1995) Devenir et effets des hydrocarbures dans le cas de l'épandage extensif de déblais de forage en agrosystème. Thèse de Doctorat ès Sciences, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, 148p.
- CHAÎNEAU C.-H., MOREL J.-L., OUDOT J. (1996) Land treatment of oil-based drill cuttings in an agricultural soil. *J. Environ. Qual.*, **4**, 858-867.
- CHAÎNEAU C.-H., MOREL J.-L., OUDOT J. (1997) Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Environ. Qual.*, **26** (6), 1478-1483.
- CHAÎNEAU C.-H., MOREL J.-L., OUDOT J. (2000) Vertical infiltration of fuel oil hydrocarbons in an agricultural soil. *Toxicol. Environ. Chem.*, **1**, 1-14.
- CHUNG N., ALEXANDER M. (1998) Differences in sequestration and bioavailability of organic compounds aged in dissimilar soils. *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 855-860.
- CLOTHIER B.E., GREEN S.R. (1997) Roots : the big movers of water and chemical in soil. *Soil Sci.*, **162** (8), 534-543.
- COLEMAN J.O.D., BLAKE-KALFF M.M.A., DAVIES T.G.E. (1997) Detoxification of xenobiotics by plants : chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.*, **2**, 144-151.
- COLLINS P.J., DOBSON A.D.W. (1996) Oxidation of fluorene and phenanthrene by Mn(II) dependent peroxidase activity in whole cultures of *Trametes (coriolus) versicolor*. *Biotechnol. Lett.*, **18** (7), 801-804.
- COLLINS P.J., KOTTERMAN M.J.J., FIELD J.A., DOBSON A.D.W. (1996) Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (12), 4563-4567.
- COMMANDEUR L.C.M., PARSONS J.R. (1990) Degradation of halogenated aromatic compounds. *Biodegradation*, **1**, 207-220.
- CORAPCIOGLU M.Y. (1992) Modeling plant uptake and biodegradation of semi-volatile hydrocarbon compounds. *Water Sci. Technol.*, **26** (7-8), 1651-1658.
- CURRIER H.B. (1954) Phytotoxicity of hydrocarbons. *J. Agric. Sci.*, 155-172.
- DREICER M. (1984) Rainsplash as a mechanism for soil contamination of plants surfaces. *Health Phys.*, **46** (1), 177-187.
- DURANT N.D., WILSON L.P., BOUWER E.J. (1995) Microcosm studies of subsurface PAH-degrading bacteria from a former manufactured gas-plant. *J. Contam. Hydrol.*, **17** (3), 213-237.
- EDWARDS N.T. (1983) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in the terrestrial environment-A review, *J. Environ. Qual.*, **12**, 427-441.

- EDWARDS N.T. (1986) Uptake, translocation and metabolism of anthracene in bush bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Environ. Toxicol. Chem.*, **5**, 659-665.
- EDWARDS N.T., ROSS-TODD B.M., GARVER E.G. (1982) Uptake and metabolism of ¹⁴C anthracene by soybean (*Glycine max*), *Environ. Exp. Bot.*, **22**, 349-357.
- EGLINTON G., HAMILTON R.J. (1967) Leaf epicuticular waxes. *Science*, **156**, 1322-1335.
- ERICKSON D.C., LOEHR R.C., NEUHAUSER E.F. (1993) PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils. *Water Res.*, **27** (5), 911-919.
- ESCHENBACH A., WIENBERG R., MAHRO B. (1998) Fate and stability of nonextractable residues of ¹⁴C-PAH in contaminated soils under environmental stress conditions. *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 2585-2590.
- FERRO A.M., SIMS R.C., BUGBEE B. (1994) Hycrest crested wheatgrass accelerates the degradation of pentachlorophenol in soil. *J. Environ. Qual.*, **23**, 272-279.
- FIELD J.A., DE JONG E., FEIJO-COSTA G., DE BONT J.A.M. (1993) Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Tibtech*, **11**, 44-49.
- FREDRICKSON J.K., BROCKMAN F.J., WORKMAN D.J., LI S.W.W., STEVENS T.O. (1991) Isolation and characterization of a subsurface bacterium capable of growth on toluene, naphthalene, and other aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57** (3), 796-803.
- GIBSON D.T., SUBRAMANIAN V. (1984) Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In MICROBIAL DEGRADATION OF ORGANIC COMPOUNDS, chap7, 181-252, Gibson D.T. Ed, Marcel Dekker Inc.
- GOODMAN B.A., ALLISON M.J., OPARKA K.J., HILLMAN J.R. (1992) Xenobiotics : their activity and mobility in plants and soils. *J. Sci. Food Agric.*, **59**, 1-20.
- GRÄF VON W. (1965) On the natural occurrence and importance of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Median. Klin.*, **60**, 561.
- GRÄF VON W., NOWAK W. (1966) Wachstumsförderung bei niederen und höheren pflanzen durch kanzerogene polyzyklische aromate. *Arch. Hyg.*, **150** (4), 49-59.
- GREENBERG B.M., HUANG X.-D., DIXON D.G., REN L., McCONKEY B.J., DUXBURY C.L. (1993) Quantitative structure activity relationships for the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to plants-A preliminary model. In ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND RISK ASSESSMENT, **2**, ASTM STP, J.W. Gorsuch, F.J. Dwyer, C.G. Ingersoll, T.W. La Point Eds, 369-378, American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- GREENBERG B.M., WILSON M.I., HUANG X.D., DUXBURY C.L., GERHARDT K.E., GENSEMER R.W. (1997) In PLANTS FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, Wang W, Gorsuch JW, Hughes JS Eds, Chapitre 1 "The effects of ultraviolet-B radiation on higher plants, 1-35, CRC Lewis Publishers Boca Raton New York
- GRIFFITHS B.S., RITZ K., EBBLEWHITE N., DOBSON G. (1999) Soil microbial community structure : effects of substrate loading rates. *Soil Biol. Biochem.*, **31**, 145-153.
- GRIFOLL M., CASELLAS M., BAYONA J.M., SOLANAS A.M. (1992) Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium : identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58** (9), 2910-2917.

- GRUND E., DENECKE B., EICHENLAUB R. (1992) Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58** (6), 1874-1877.
- GÜNTHER T., DORNBERGER U., FRITSCHÉ W. (1996) Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere*, **33** (2), 203-215.
- GUTHRIE E.A., PFAENDER F.K. (1998) Reduced pyrene bioavailability in microbially active soils. *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 501-508.
- HABIB L., CHENU C., MOREL J.-L., GUCKERT A. (1990a) Adsorption de mucilages racinaires de maïs sur des argiles homoioniques. Conséquences sur la micro-organisation des complexes formés, C.R. Acad. Sci. Paris, t.310, série II, 1541-1546.
- HABIB L., MOREL J.-L., GUCKERT A., PLANTUREUX S., CHENU C. (1990b) Influence of root exudates on soil aggregation, *Symbiosis*, **9**, 87-91.
- HAIDER K., HEINEMEYER O., MOSIER A.R. (1989) Effects of growing plants on humus and plant residue decomposition in soil; uptake of decomposition products by plants. *Sci. Tot. Environ.*, **81/82**, 661-670.
- HARMS H. (1977) Benzo[a]pyrene metabolites formed by plant cells. *Z. Natur. Forsch., C J. Biosci.*, **32**, 321-326.
- HARMS H.H. (1983) Uptake and conversion of three different 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cell suspension cultures of various Chenopodiaceae-species. *Z. Natur. Forsch., C J. Biosci.*, **38**, 382-386.
- HARMS H.H. (1996) Bioaccumulation and metabolic fate of sewage sludge derived organic xenobiotics in plants. *Sci. Tot. Environ.*, **185**, 83-92.
- HATZINGER P.B., ALEXANDER M. (1997) Biodegradation of organic compounds sequestered in organic solids or in nanopores within silica particles. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16** (11), 2215-2221.
- HAVIS J.R. (1949) Herbicidal properties of petroleum hydrocarbons. Department of vegetable crops, Cornell University, 3-19.
- HAYES L.A., NEVIN K.P., LOVLEY D.R. (1999) Role of prior exposure on anaerobic degradation of naphthalene and phenanthrene in sediments. *Org. Geochem.*, **30** (8), 937-945.
- HELLER R., ESNAULT R., LANCE C. (1995) Physiologie végétale-2. Développement 5^{ème} édition., Masson, pp315.
- HILTNER L. (1904) Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbakteriologie unter besonderer berücksichtigung der gründung und brache. *Arb. Deut. Letw. Ges.*, **98**, 59-78.
- HODGE A., ROBINSON D., GRIFFITHS B.S., FITTER A.H. (1999) Why plants bother : root proliferation results in increased nitrogen capture from an organic patch when two grasses compete. *Plant Cell Environ.*, **22**, 811-820.
- HUANG X.-D., DIXON D.G., GREENBERG B.M. (1993) Impacts of UV radiation and photomodification on the toxicity of PAHs to the higher plant *Lemna gibba* (duckweed). *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**, 1067-1077.
- HUANG X.-D., ZEILER L.F., DIXON D.G., GREENBERG B.M. (1996) Photoinduced toxicity of PAHs to the foliar regions of *Brassica napus* (canola) and *Cucumis sativus* (Cucumber) in simulated solar radiation. *Ecotox. Environ. Saf.*, **35**, 190-197.

- HULZEBOS E.M., ADEMA D.M.M., DIRVEN-VAN BREEMEN E.M., HENZEN L., VAN DIS W.A., HERBOLD H.A., HOEKSTRA J.A., BAERSELMAN R., VAN GESTEL C.A.M. (1993) Phytotoxicity studies with *Lactuca sativa* in soil and nutrient solution. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**, 1079-1094.
- HYZY J.B., SCHEPART B.S. (1995) Bioremediation of oil tar-contaminated soil. In BIOREMEDIATION OF POLLUTANTS IN SOIL AND WATER, ASTM STP 1235, Schepart BS Ed, American Society for testing and Materials, Philadelphia, 61-74.
- IVENS G.W. (1952) The phytotoxicity of mineral oils and hydrocarbons. *Ann. Appl. Biol.*, **39**, 418-422.
- JENKINSON D.S. (1966) The priming action. In THE USE OF ISOTOPE IN SOIL ORGANIC MATTER STUDIES ; Report for the FAO/IAEA, 199-208, Braunschweig, Pergamon Press, new-York, 199-208.
- JOHANNES C., MAJCHERCZYK A., HÜTTERMANN A. (1996) Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 313-317.
- KARICKHOFF S.W. (1980) Sorption kinetics of hydrophobic pollutants in natural sediments. In CONTAMINANTS AND SEDIMENTS vol II, Baker R.A. Ed, 1 Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, 93-204
- KARIMI-LOTFABAD S., PICKARD M.A., GRAY M.R. (1996) Reactions of polynuclear aromatic hydrocarbons on soil. *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 1145-1151.
- KÄSTNER M., LOTTER S., HEERENKLAGE J., BREUEUR-JAMMALI M., STEGMANN R., MAHRO B. (1995) Fate of ¹⁴C-labeled anthracene and hexadecane in compost-manured soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 1128-1135.
- KÄSTNER M., BREUEUR-JAMMALI M., MAHRO B. (1994) Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 267-273.
- KÄSTNER M., 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (1), 359-362.
- KEYMEULEN R., VAN LANGENHOVE H., SCHAMP N. (1991) Determination of monocyclic aromatic hydrocarbons in plant cuticles by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **541**, 83-88.
- KIPOPOULOU A.M., MANOLI E., SAMARA C. (1999) Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. *Environ. Pollut.*, **106** (3), 369-380.
- KOHL S.D., RICE J.A. (1998) The binding of contaminants to humin : a mass balance. *Chemosphere*, **36** (2), 251-261.
- KOHL S.D., RICE J.A. (1999) Contribution of lipids to the nonlinear sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to soil organic matter. *Org. Geochem.*, **30** (8), 929-936.
- KOLATTUKUDY P.E. (1980) Biopolyester membranes of plants : cutin and suberin. *Science*, **208**, 990-1000.
- KOLATTUKUDY P.E., KRONMAN K., POULOSE A.J. (1975) Determination of structure and composition of suberin from the roots of carrot, parsnip, rutabaga, turnip, red beet, and sweet potato by combined gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Plant Physiol.*, **55**, 567-573.

- KOLATTUKUDY P.E., WALTON T.J. (1972) The biochemistry of plant cuticular lipids. In PROGRESS IN THE CHEMISTRY OF FATS AND OTHER LIPIDS, Holman RT Ed, XIII, Part 3, Pergamon, 121-164.
- KUBICKI J.D., APITZ S.E. (1999) Models of natural organic matter and interactions with organic contaminants. *Org. Geochem.*, **30** (8), 911-927.
- LAFLAMME R.E., HITES R.A. (1978) The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **42**, 289-303.
- LARSSON B., SAHLBERG G. (1981) Polycyclic aromatic hydrocarbons in lettuce. Influence of a highway and aluminium smelter. In Polynuclear Aromatic Hydrocarbons; Physical and Biological Chemistry, Sixth Int. Symp. On PAH, Cooke, Dennis Fisher Eds, Battelle Columbus Lab. Press, Columbus, Ohio 417-426.
- LEE E., BANKS M.K. (1993) Bioremediation of petroleum contaminated soil using vegetation : a microbial study. *J. Environ. Sci. Health, Part A*, **28**, 2187-2198.
- LICHTFOUSE E., BUDZINSKI H., GARRIGUES P., EGLINTON T.I. (1997) Ancient polycyclic aromatic hydrocarbons in modern soils : ^{13}C , ^{14}C and biomarker evidence . *Org. Geochem.*, **26**, 353-359.
- LINDSTROM F.T., BOERSMA L., MCFARLANE C. (1991) Mathematical model of plant uptake and translocation of organic chemicals : development of the model. *J. Environ. Qual.*, **20**, 129-136.
- LISTE H.-H., ALEXANDER M. (2000a) Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil. *Chemosphere*, **40**, 11-14.
- LISTE H.-H., ALEXANDER M. (2000b) Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere*, **40**, 7-10.
- MAC CARTHY J.F., JIMENEZ B.D. (1985) Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved humic material : binding and dissociation. *Environ. Sci. Technol.*, **19** (11), 1072-1076.
- MCFARLANE C., PFLEEGER T. (1990) Effect, uptake and disposition of nitrobenzene in several terrestrial plants. *Environ. Toxicol. Chem.*, **9**, 513-520.
- MCFARLANE J.C., PFLEEGER T., FLETCHER J. (1987) Transpiration effect on the uptake and distribution of bromacil, nitrobenzene and phenol in soybean plants. *J. Environ. Qual.*, **16** (4), 372-376.
- MACKAY D., SHIN W.-Y. *et al.* (1991) Illustrated Handbook of physical-chemical properties and environmental fate of organic chemicals, II, Lewis, Chelsea, Mich Publishers.
- MARSCHNER B., BASCHIEN C., SARNES M., DÖRING U. (1999) Effects of pH, electrolytes and microbial activity on the mobilization of PCB and PAH in sandy soil. In EFFECT OF MINERAL-ORGANIC-MICROORGANISM INTERACTIONS ON SOIL AND FRESHWATER ENVIRONMENTS. Berthelin J., Huang P.M., Bollag J.-M., Andreux F. Eds, 227-236, Kuwer Academic/Plenum publishers.
- MAXIN C.R., KÖGEL-KNABNER I. (1995) Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) to water-soluble soil organic matter. *Eur. J. Soil Sci.*, **46**, 193-204.
- MENN F.-M., APPEGATE B.M., SAYLER G.S. (1993) NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** (6), 1938-1942.
- MICHAELIS W., RICHNOW H.H., SEIFERT R. (1995) Chemically bound chlorinated aromatics in humic substances. *Naturwissenschaften*, **82**, 139-142.

- MINEKI S., SUGITA K., GOTO S., WATANABE I., MIZOGUCHI T., ISHII T., IIDA M. (1996) Isolation and some properties of bacteria that degrade polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycycl. Aromat. Compd.*, **11**, 115-123.
- MOREL J.-L. (1985) Contribution à l'étude du transfert des métaux lourds dans le système sol-plante : le rôle des mucilages racinaires. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, 175 pages.
- MOREL J.-L., HABIB L., PLANTUREUX S., GUCKERT A. (1991) Influence of maize root mucilage on soil aggregate stability. *Plant Soil*, **136**, 111-119.
- NANNY M.A. (1999) Deuterium NMR characterization of noncovalent interactions between monoaromatic compounds and fulvic acids. *Org. Geochem.*, **30** (8), 909-909.
- NARAYANAN M., DAVIS L.C., TRACY J.C., ERICKSON L.E., GREEN R.M. (1995) Experimental and modeling studies of the fate of organic contaminants in the presence of alfalfa plants. *J. Hazard. Mater.*, **41**, 229-249.
- NARDI S., RENIERO F., CONCHERI G. (1997) Soil organic matter mobilization by root exudates of three maize hybrids. *Chemosphere*, **35** (10), 2237-2244.
- NISBET I.C.T., LAGOY P.K. (1992) Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **16**, 290-300.
- NOVAK S., PORTAL J.M. *et al.* (1998) Mouvement des produits phytosanitaires dans le sol et dynamique de transfert par l'eau. *Compte Rendus de l'Académie d'Agriculture*, **84**, 119-132.
- NOVOTNY C., ERBANOVA P., SASEK V., KUBATOVA A., CAJTHAML T., LANG E., KRAHL J., ZADRAZIL F. (1999) Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation*, **10**, 159-168.
- NYE P.H., TINKER P.B. (1977) In SOLUTE MOVEMENT IN THE SOIL-ROOT SYSTEM, Studies in ecology, **14**, Blackwell Scientific Pub., 92-126.
- OCKENDEN W.A., STEINNES E., PARKER C., JONES K.C. (1998) Observations on persistent organic pollutants in plants : implications for their use as passive air samplers and for POP cycling. *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 2721-2726.
- OECD Guidelines For Testing of Chemicals (1996) Adsorption/Desorption using a batch equilibrium method, 26p.
- ONKEN B.M., TRAINA S.J. (1997) The sorption of pyrene and anthracene to humic acid-mineral complexes : effect of fractional organic carbon content. *J. Environ. Qual.*, **26**, 1326-1332.
- OUDOT J. (1994) Soil pollution by petroleum products and treatment. *Analisis*, **22** (2), 16-18.
- PATERSON E., SIM A. (1999) Rhizodeposition and C-partitioning of *Lolium perenne* in axenic culture affected by N supply and defoliation. *Plant Soil*, **216**, 155-164.
- PATERSON S., MACKAY D., TAM D., SHIU W.Y. (1990) Uptake of organic chemicals by plants : a review of processes, correlations and models. *Chemosphere*, **21** (3), 297-331.
- PERRIN-GANIER C., MALTERRE F., SCHIAVON M. (1999) A combustion method for quantitative determination of 14-C bound residues in soil. In RESEARCH METHODS TO ASSESS THE ENVIRONMENTAL FATE OF PESTICIDE, COST 66- Collective book, in press.
- PRADHAN S.P., CONRAD J.R., PATEREK J.R., SRIVASTAVA V.J. (1998) Potential of phytoremediation for treatment of PAHs in soil at MGP sites. *J. Soil Contam.*, **7** (4), 467-480.

- QIU X., SHAH S.I., KENDALL E.W., SORENSEN D.L., SIMS R.C., ENGELKE M.C. (1994) Grass-enhanced bioremediation for clay soils contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons. In BIOREMEDIATION THROUGH RHIZOSPHERE TECHNOLOGY, Chap13, Anderson T.A., Coats J.R. eds, ACS Symposium Series, 142-147, American Chemical Society.
- REEVES R.D., BAKER A.J.M., BORHIDI A., BERAZAIN R. (1996) Nickel-accumulating plants from the ancient serpentine soils of Cuba. *New Phytol.*, **133**, 217-224.
- REILLEY K.A., BANKS M.K., SCHWAB A.P. (1996) Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *J. Environ. Qual.*, **25**, 212-219.
- REN L., ZEILER L.F., DIXON D.G., GREENBERG B.M. (1996) Photoinduced effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on *Brassica napus* (canola) during germination and early seedling development. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **33**, 73-80.
- RESSLER B.P., KNEIFEL H., WINTER J. (1999) Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and formation of humic acid-like residues during bacterial PAH degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 85-91.
- REYNOLDS T. (1977) Comparative effects of aliphatic compounds on inhibition of lettuce fruit germination. *Ann. Bot.*, **41**, 637-648.
- REYNOLDS T. (1978) Comparative effects of aromatic compounds on inhibition of lettuce fruit germination. *Ann. Bot.*, **42**, 419-427.
- REYNOLDS T. (1987) Comparative effects of alicyclic compounds and quinones on inhibition of lettuce fruit germination. *Ann. Bot.*, **60**, 215-223.
- RICHNOW H.H., SEIFERT R., HEFTER J., LINK M., FRANCKE W., SCHAEFER G., MICHAELIS W. (1997) Organic pollutants associated with macromolecular soil organic matter : mode of binding. *Org. Geochem.*, **26** (11-12), 745-758.
- RICHNOW H.H., SEIFERT R., HEFTER J., KÄSTNER M., MAHRO B., MICHAELIS W. (1994) Metabolites of xenobiotica and mineral oil constituents linked to macromolecular organic matter in polluted environments. *Org. Geochem.*, **22** (3-5), 671-681.
- RICHNOW H.H., SEIFERT R., KÄSTNER M., MAHRO B., HORSFIELD B., TIEDGEN U., BOHM S., MICHAELIS W. (1995) Rapid screening of PAH-residues in bioremediated soils. *Chemosphere*, **31** (8), 3991-3999.
- ROVIRA A.D. (1959) Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. IV. Influence of plant species, age of plant, light, temperature, and calcium nutrition on exudation. *Plant Soil*, **XI** (1), 53-64.
- ROVIRA A.D. (1973) Zones of exudation along plant roots and spatial distribution of micro-organisms in the rhizosphere. *Pestic. Sci.*, **4**, 361-366.
- ROVIRA A.D. (1969) Plant root exudates. *Bot. Rev.*, **35** (1), 35-57.
- RYAN J.A., BELL R.M., DAVIDSON J.M., O'CONNOR G.A. (1988) Plant uptake of non-ionic organic chemicals from soils. *Chemosphere*, **17** (12), 2299-2323.
- SABLJIC A., GÜSTEN H. (1990) Modeling plant uptake of airborne organic chemicals. 1. Plant cuticle/water partitioning and molecular connectivity. *Environ. Sci. Technol.*, **24**, 1321-1326.
- SACK U., GÜNTHER T. (1993) Metabolism of PAH by fungi and correlation with extracellular enzymatic activities. *J. Basic Microbiol.*, **33** (4), 269-277.

- SAISON C., PERRIN-GANIER C., MOREL J.-L. (1999) Adsorption des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur les composés du sol. Affiche présentée au congrès de la Section Française de l'International Humic Substances Society, Versailles, 4-6 Juin.
- SANDERMANN T. Jr, SCHEEL D., TRENCK T. (1983) Metabolism of environmental chemicals by plants-Copolymerization into lignin. *J. Appl. Polym. Sci., Appl. Polym. Symp.*, **37**, 407-420.
- SATTELMACHER B., MUHLING K.-H., PENNEWISS K. (1998) The apoplast-its significance for the nutrition of higher plants. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.*, **161**, 485-498.
- SAYER J.M., YAGI H., WOOD A.W., CONNEY A.H., JERINA D.M. (1982) Extremely facile reaction between the ultimate carcinogen benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide and ellagic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5562-5564.
- SCHEUNERT I., QIAO Z., KORTE F. (1986) Comparative studies of the fate of atrazine-¹⁴C and pentachlorophenol-¹⁴C in various laboratory and outdoor soil-plant systems. *J. Environ. Sci. Health, Part B, Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*, **21** (6), 457-485.
- SCHIAVON M. (1980) Contribution à l'étude du mouvement et de la dégradation de l'atrazine dans deux sols agricoles drainés. Doctorat ès Sciences Naturelles, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, 193p.
- SCHNÖDER F., MITTELSTAEDT W., FÜHR F. (1993) Das Verhalten von Benzo[a]pyren und Fluoranthen in einer parabraunerde-Lysimeter-und Laborabbaustudien. *Schriftenr. Biol. Abwasserreinigung*, **4**, 217-230.
- SCHOENY R., CODY T., WARSHAWSKY D., RADIKE M. (1988) Metabolism of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons by photosynthetic algal species. *Mutat. Res.*, **197**, 289-302.
- SCHRENK C., STEINBERG C.E.W. (1998) Metabolism of phenanthrene in cell suspension cultures of wheat and soybean as well as in intact plants of the water moss *Fontinalis antipyretica*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **5** (2), 83-88.
- SCHROLL R., BIERLING B., CAO G., DORFLER U., LAHANIATI M., LANGENBACH T., SCHEUNERT I., WINKLER R. (1994) Uptake pathways of organic chemicals from soil by agricultural plants. *Chemosphere*, **28** (2), 297-303.
- SCHWAB A.P., BANKS M.K. (1994) Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root zone. In *BIOREMEDIATION THROUGH RHIZOSPHERE TECHNOLOGY*, Anderson T.A., Coats J.R. eds, ACS Symposium Series, 132-141, American Chemical Society.
- SCHWAB A.P., AL-ASSI A.A., BANKS M.K. (1998) Adsorption of naphthalene onto plant roots. *J. Environ. Qual.*, **27**, 220-224.
- SCHWARTZ C. (1997) Phytoextraction des métaux des sols pollués par la plante hyperaccumulatrice *Thlaspi caerulescens*, Thèse de Doctorat ès Sciences, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, 174p.
- SCHWARTZ C., MOREL J.-L., SAUMIER S., WHITING S.N., BAKER A.J.M. (1999) Root development of the zinc-hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens* as affected by metal origin, content and localization in soil. *Plant Soil*, **208**, 103-115.
- SCHWARZ O.J., JONES L.W. (1997) Bioaccumulation of xenobiotic organic chemicals by terrestrial plants. In *PLANTS FOR ENVIRONMENTAL STUDIES*, Wang W., Gorsuch J.W., Hughes J.S. Eds, chap 14, 417-449.

- SCOW K.M., JOHNSON C.R. (1997) Effect of sorption on biodegradation of soil pollutants. *Adv. Agronomy*, **58**, 1-56.
- SHONE M.G.T., BARTLETT B.O., WOOD A.W. (1974) A comparison of the uptake and translocation of some organic herbicides and a systemic fungicide by barley. *J. Exp. Bot.*, **25** (85), 401-409.
- SIMS R.C., OVERCASH M.R. (1983) Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Residue Rev.*, **88**, 1-68.
- SMITH M.R. (1990) The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation*, **1**, 191-206.
- SRIVASTAVA V.J., KELLEY R.L., PATEREK J.R., HAYES T.D., NELSON G.L., GOLCHIN J. (1994) A field-scale demonstration of a novel bioremediation process for MGP sites. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **45/46**, 741-756.
- TERJE K. (1984) Effects of oil pollution on the germination and vegetative growth of five species of vascular plant. *Oil Petrochem. Pollut.*, **2**, 25-30.
- THIELE S., BRÜMMER G.W. (1998) PAK-Abnahmen in Bodenproben verschiedener Altlaststandorte bei Aktivierung der autochthonen Mikroflora. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.*, **161**, 221-227.
- TOPP E., SCHEUNERT I., ATTAR A., KORTE F. (1986) Factors affecting the uptake of ¹⁴C-labeled organic chemicals by plants from soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **11**, 219-228.
- TRENCK T., SANDERMANN Jr H. (1981) Incorporation of benzo[a]pyrene quinones into lignin. *FEBS Lett.*, **125** (1), 72-76.
- UDO E.J., FAYEMI A.A.A. (1975) The effect of oil pollution of soil on germination, growth and nutrient uptake of corn. *J. Environ. Qual.*, **4**, 537-540.
- URAZEE F.A., VENOSA A.D., SUIDAN M.T. A model for diffusion controlled bioavailability of crude oil components. *Biodegradation*, **8**, 287-296.
- VANDERFORD M., SHANKS J.V., HUGHES J.B. (1997) Phytotransformation of trinitrotoluene (TNT) and distribution of metabolic products in *Myriophyllum aquaticum*. *Biotechnol. Lett.*, **19** (3), 277-280.
- VAN DER MEER J.R., DE VOS W.M., HARAYAMA S., ZEHNDER A.J.B. (1992) Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.*, **56** (4), 677-694.
- VAUGHAN D., ORD B. (1990) Influence of phenolic acids on morphological changes in roots of *Pisum sativum*, **52**, 289-299.
- VERCAMER P., N'GUYEN H.P., FACCENDINI J.P. (1996) Le devenir dans le sous-sol des résidus d'anciennes usines à gaz. 113^{ème} Congrès du Gaz, 121-139.
- VERSTRAETE W., DEVLIEGHER W. (1996) Formation of non-bioavailable organic residues in soil: perspectives for site remediation. *Biodegradation*, **7**, 471-485.
- WAGNER K.H., WAGNER-HERING E. (1971) The cycle of cancer-causing substances-polycyclic aromatic hydrocarbons-in plants and humans. *Protectio Vitae*, **6**, 260.
- WARSHAWSKY D., CODY T., RADIKE M., REILMAN R., SCHUMANN B., LA DOW K., SCHNEIDER J. (1995) Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chem.-Biol. Interact.*, **97**, 131-148.

WHITE K.L. Jr (1986) An overview of immunotoxicology and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Environ. Sci. Health, Part C, Environ. Carcinog. Rev.*, **4** (2), 163-202.

WILD S.R., JONES K.C. (1991) Studies on the polynuclear aromatic hydrocarbon content of carrots (*Daucus carota*). *Chemosphere*, **23** (2), 243-251.

WILD S.R., JONES K.C. (1992) Organic chemicals entering agricultural soils in sewage sludges : screening for their potential to transfer to crop plants and livestock. *Sci. Tot. Environ.*, **119**, 85-119.

WOLTER M., ZADRAZIL F., MARTENS R., BAHADIR M. (1997) Degradation of eight highly condensed polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus* sp. Florida in solid wheat straw substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 398-404.

ANNEXE : Tableau des espèces végétales identifiées sur les sites d'AUG

Famille	Nom français	Nom latin	Caractères
Acérinées	Erable sycomore	<i>Acer Pseudo-platanus</i>	
Balsaminacées	Impatient-ne-me-touchez-pas	<i>Impatiens noli-tangere</i>	Sols argileux, à l'ombre et versants caillouteux
Bétulacées	Bouleau	<i>Betula</i>	
Boraginacées	Vipérine commune	<i>Echium vulgare</i>	Remblais de chemin de fer et décombres, sols caillouteux
	Myosotis	<i>Myosotis</i>	Sols argileux, légèrement calcifuge
Brassicacées	Diploaxis à feuilles ténues	<i>Diploaxis tenuifolia</i>	Cailloutis, décombres et terres incultes, sols calcaires
	Moutarde des champs	<i>Sinapis arvensis</i>	Champs et décombres; sols calcaires et riches
	Sysimbre officinal	<i>Sysimbrium officinale</i>	Chemins, décombres et remblais, murs et ruines, indicateur d'azote
Caryophyllacées	Silène dioïque	<i>Silene dioica</i>	Sols riches en substances nutritives et humides, nitrophile
Chenopodiacées	Chénopode hybride	<i>Chenopodium hybridum</i>	
	Chénopode des murs	<i>Chenopodium murale</i>	
Composées	Anthemis	<i>Anthemis</i>	Mauvaise herbe des champs et chemins, sols azotés et acides
	Armoise commune	<i>Artemisia vulgaris</i>	Chemins, remblais de chemin de fer, décombres, nitrophile
	Cirse des champs	<i>Cirsium arvensis</i>	Mauvaise herbe des champs et décombres, Sols argileux et profonds
	Vergerette annuelle	<i>Erigeron annuus</i>	
	Erigéron du Canada	<i>Erigeron canadensis</i>	Espèce pionnière
	Matricaire perforée	<i>Matricaria inodora</i>	Chemins et décombres, rarement remblais, nitrophile
	Séneçon vulgaire	<i>Senecio vulgaris</i>	Mauvaise herbe des champs et décombres, nitrophile
	Laiteron maraîcher	<i>Sonchus oleraceus</i>	Champs, chemins, décombres; nitrophile, sols riches
	Laiteron rude	<i>Sonchus asper</i>	
Tanaisie commune	<i>Tanacetum vulgare</i>	Chemins, remblais de chemin de fer et	

			décombres, sols argileux , riches
	Pissenlit	<i>Taraxacum</i>	Décombres, nitrophile
Crassulacées	Sedum âcre	<i>Sedum acrum</i>	
	Sedum blanc	<i>Sedum album</i>	
Equisétacées	Prêle des marais	<i>Equisetum palustre</i>	
Fagacées	Chêne Rouvre	<i>Quercus robur</i>	
Géraniacées	Géranium de Robert	<i>Geranium robertianum</i>	Forêts, éboulis, murs, sols humides, nitrophile
Graminées	Brome	<i>Bromus</i>	
	Chiendent pied-de-poule	<i>Cynodon dactylon</i>	
	Digitaire sanguine	<i>Digitaria sanguinalis</i>	
	Fétuque rouge	<i>Festuca rubra</i>	
	Pâturin annuel	<i>Poa annua</i>	
	Vulpie queue de rat	<i>Vulpia myuros</i>	
Hypéricinées	Millepertuis perforé	<i>Hypericum perforatum</i>	Sols différents
Labiacées	Brunelle commune	<i>Brunella vulgaris</i>	
	Hysope officinal	<i>Hysopus officinalis</i>	
Loganiacées	Buddleia	<i>Buddleia davidii</i>	Sols caillouteux, murs; rustique
Ombellifères	Carotte sauvage	<i>Daucus carota</i>	Prés, chemins, décombres
Onagrariées	Epilobe perforée	<i>Epilobium perforatum</i>	
	Epilobe à quatre angles	<i>Epilobium angustifolium</i>	
	Onagre bisannuelle	<i>Oenothera biennis</i>	Remblais et décombres
Papavéracées	Coquelicot	<i>Papaver Rhoëas</i>	Mauvaise herbe des champs, décombres, sols riches en substances nutritives, sols calcaires
Papilionacées	Mélicot blanc	<i>Melilotus alba</i>	Sols argileux, caillouteux et azotés; remblais et décombres
	Trèfle des champs	<i>Trifolium campestre</i>	Terrains sablonneux, calcifuge
	Vesce jarosse	<i>Vicia cracca</i>	
Plantaginacées	Plantain lancéolé	<i>Plantago lanceolata</i>	Bords de chemin et décombres, sols sablonneux et riches
Polygonacées	Renouée persicaire	<i>Polygonum persicaria</i>	Champs et décombres, bords de rues et

sentiers, nitrophile

Renonculacées	Clématite vigne-blanche	<i>Clematis Vitalba</i>	Sols calcaires et azotés
	Potentille rampante	<i>Potentilla reptans</i>	
Résédacées	Réséda jaune	<i>Reseda luteola</i>	Remblais, décombres; sols riches et sablonneux
Rosacées	Aubépine épineuse	<i>Crataegus oxyacantha</i>	Forêts, décombres, plateaux rocaillieux, sols calcaires
	Fraisier	<i>Fragaria</i>	
	Benoîte commune	<i>Geum urbanum</i>	Décharges, chemin, sols azotés et humides
	Ronces	<i>Rubus</i>	
	Ronce commune	<i>Rubus fruticosus</i>	
Rubiacées	Gaillet gratteron	<i>Galium aparine</i>	Champs et décombres; sols argileux, humides, riches en azote et en substances nutritives
Salicinées	Peuplier	<i>Populus Tremula</i>	
Scrofullariacées	Scrofulaire Scorodoine	<i>Scrofularia Scorodonia</i>	
Solanacées	Morelle douce-amère	<i>Solanum Dulcamara</i>	Murs et décombres, sols argileux et azotés
	Morelle noire	<i>Solanum nigrum</i>	
Urticacées	Ortie dioïque	<i>Urtica dioica</i>	Décombres, indicateur d'azote et d'humidité
Verbascées	Bouillon blanc	<i>Verbascum Thapsus</i>	Décharges, remblais, chemins; sols légers, azotés, caillouteux, contient saponines et mucilages

Liste des figures

Introduction générale

Figure 1 : Formule chimique et masse moléculaire des 16 HAP sélectionnés par l'Agence américaine de Protection de l'Environnement (EPA) comme polluants prioritaires pour leur étude et leur élimination de l'environnement.

Figure 2 : Conditions gouvernant la mise en œuvre d'un traitement des terres par phytoremédiation.

Chapitre 1

Figure 3 : Schéma du dispositif expérimental utilisé pour tester l'effet de la fraction volatile d'un goudron sur la germination d'une espèce végétale.

Figure 4 : Dispositif expérimental permettant de visualiser le développement racinaire des espèces végétales testées ou rhizotron.

Figure 5 : Différentes modalités de remplissage des rhizotrons.

Figure 6 : Germination de l'orge de printemps sur les terres d'ancienne usine à gaz G1 et G2 ainsi que sur la terre agricole témoin.

Figure 7 : Germination du trèfle violet sur les terres d'ancienne usine à gaz et G2 ainsi que sur la terre agricole témoin.

Figure 8 : Germination de l'orge en présence de terre agricole témoin et de terre agricole mélangée à des concentrations croissantes de goudron d'anciennes usines à gaz. *Les écart-types sont inférieurs à la taille des symboles.*

Figure 9 : Courbes dose-réponse de la germination du colza et de l'orge après 8 jours de contact avec des concentrations croissantes de goudron dans la terre agricole.

Figure 10 : Courbes dose-réponse de la germination de l'orge et du colza après 8 jours de contact avec la terre agricole contaminée par des concentrations croissantes de goudron, en conditions permettant la dilution ou non des composés volatils dans l'atmosphère.

Figure 11 : Chromatogramme du courant ionique total et du courant ionique caractéristique du naphthalène ($m/z=128$), des méthyl-naphthalènes ($m/z=142$) et des diméthyl-naphthalènes ($m/z=156$).

Figure 12 : Germination du colza en présence d'eau distillée (témoin) ou de solution aqueuse saturée en naphthalène et benzo[a]pyrène. Nb : les courbes relatives au phénanthrène et au fluoranthène sont comprises entre celle du témoin et celle du naphthalène, la courbe relative au chrysène est pratiquement confondue avec celle du benzo[a]pyrène.

Figure 13 : Germination du colza en présence de terres d'anciennes usines à gaz G1 et G2 prétraitées et de la terre agricole témoin.

Figure 14 : Courbes de croissance de l'orge en présence des terres d'anciennes usines à gaz G1 et G2 et de la terre agricole témoin. *Les écart-types sont inférieurs à la taille des marques.*

Figure 15 : Hauteurs des plantules des différentes espèces, mesurées après 63 jours de culture en vases de végétation remplis de terre d'ancienne usine à gaz G1 et G2 ou de terre agricole témoin. Résultats exprimés % de la hauteur des plantules ayant poussé sur la terre témoin.

Figure 16 : Courbes de croissance du maïs en présence de terre agricole sans phénanthrène ou de terre agricole contaminée par du phénanthrène. Nb : Les courbes de croissance du maïs en présence de 1,72 mg phénanthrène kg^{-1} terre et 3,63 mg phénanthrène kg^{-1} terre sont comprises entre celle du témoin et celle à la concentration de 72,6 mg phénanthrène kg^{-1} terre.

Figure 17 à 24 : Développement racinaire du ray-grass après 1 mois sur les différents rhizotrons.

Chapitre 2

Figure 25 : Plantule de moutarde blanche (*Sinapis alba*) et détail d'un poil absorbant (d'après Heller *et al.*, 1977).

Figure 26 : Coupe transversale de racine montrant l'évolution du potentiel osmotique ψ_0 et du potentiel hydrique ψ .

Figure 27 : Voies de passage de l'eau et des espèces dissoutes dans la plante (d'après Heller *et al.*, 1977). 1) apoplasme, 2) symplasme, 3) de vacuole à vacuole. Co : cellules du cortex; E : endoderme; Pe : péricycle; PV : parenchyme vasculaire; V : vaisseau conducteur.

Figure 28 : Barrières des parties végétales aériennes (d'après Goodman *et al.*, 1992).

Figure 29 : Relations entre la constante de dissociation (pKa) et le log Kow, en regard de la systémicité des xénobiotiques.

Figure 30 : Relation entre le Root Concentration Factor et le log Kow de molécules xénobiotiques (d'après Briggs *et al.*, 1982).

Figure 31 : Relation entre le Transpiration Stream Concentration Factor et le log Kow de molécules xénobiotiques (d'après Briggs *et al.*, 1982).

Figure 32 : (a) Relation entre le Stem Concentration Factor et le log Kow de xénobiotiques en présence de solution et de sol; (b) Evolution de la relation en fonction de la teneur en matières organiques du sol.

Figure 33 : Processus de détoxification des xénobiotiques dans la cellule végétale (d'après Coleman *et al.*, 1997); CT : transporteur conjugué du glutathion; AT : transporteur ATP-dépendant des xénobiotiques anioniques; GT : transporteur ATP-dépendant conjugué des glucosides; VP : peptidase vacuolaire.

Figure 34 : Formule chimique de l'acide éllagique.

Figure 35 : Dispositif expérimental pour l'étude du transfert de HAP d'une solution nutritive vers les plantules de maïs.

Figure 36 : Chromatogrammes d'un extrait de feuilles de maïs après 1 mois de culture en solution hydroponique en présence de phénanthrène marqué au deutérium. Analyse par spectrométrie de masse. (a) courant ionique total entre 16.6 et 19 min; (b) m/z 178 caractéristique du phénanthrène et (c) m/z 188 caractéristique du phénanthrène-D₁₀.

Chapitre 3

Figure 37 : Devenir des HAP dans le sol (d'après Barriuso *et al.*, 1996)

Figure 38 : Différentes formes prises par un polluant organique dans un sol (d'après Verstraete & Devliegher, 1996).

Figure 39 : Principales voies de dégradation biologique des HAP

Figure 40 à 43 : Profils racinaires des espèces végétales utilisées.

Figure 44 : Profil de sol SP1 réalisé dans la zone où la contamination moyenne en HAP des terres de surface est comprise entre 50 et 500 mg kg⁻¹.

Figure 45 : Profil de sol SP2 réalisé dans la zone où la contamination moyenne en HAP des terres de surface est supérieure à 5000 mg kg⁻¹.

Figure 46 : Profil de sol SP3 réalisé dans la zone où la contamination moyenne en HAP des terres de surface est comprise entre 500 et 5000 mg kg⁻¹.

Figure 47 : Teneur en 16 HAP des terres rhizosphériques et des terres non rhizosphériques prélevées au niveau de l'horizon de surface du profil SP1. Na : naphthalène; Ay : acénaphthylène; A : acénaphthène; F : fluorène; P : phénanthrène; An : anthracène; Fl : fluoranthène; Py : pyrène; BaA : benzo[a]anthracène; Ch : chrysène; BbF : benzo[b]fluoranthène; BkF : benzo[k]fluoranthène; BaP : benzo[a]pyrène; I : indéno[1,2,3-c,d]pyrène; Bper : dibenz[g,h,i]pérylène; DBA : dibenz[a,h]anthracène.

Figure 48 : Teneur en HAP des terres rhizosphériques et non rhizosphériques prélevées dans l'horizon de surface du profil SP2.

Figure 49 : Teneur en HAP des terres rhizosphériques et non rhizosphériques prélevées dans l'horizon de surface du profil SP3.

Figures 50 à 54 : Evolution de la teneur en HAP purs dans la terre agricole plantée ou non en ray-grass au cours des 6 mois de culture en vases de végétation.

Figure 55 : Teneur moyenne en cinq HAP extraits par le solvant de la terre agricole plantée ou non plantée en ray-grass après 6 mois de culture en vases de végétation, et teneur en HAP récupérés après déstructuration des matières organiques de ces échantillons extraits.

Figure 56 : Compartiments représentant les différentes formes des HAP dans le sol, relations entre compartiments et conséquences sur le devenir des HAP.

Figure 57 : Teneur en HAP dans le niveau de surface (0-10 cm) à la mise en place et après 180 jours de culture des colonnes non plantées et des colonnes plantées (exemple du fluoranthène).

Figure 58 : Teneur en HAP de la terre de profondeur (34-42 cm) à la mise en place et après 180 jours en fonction du traitement (planté ou non) (exemple du fluoranthène).

Figure 59 : Teneur en HAP après 180 jours des colonnes (n=5) plantées avec l'association des 3 espèces graminées (brome, dactyle et fétuque) en fonction de la profondeur comparée à la teneur de départ : cas du fluoranthène.

Figure 60 : Evolution du pH des lixiviats de terres d'AUG G1 (1600 mg HAP kg⁻¹ terre) et G2 (3500 mg HAP kg⁻¹ terre) en présence ou absence de plante en dispositif de lysimètres. Les valeurs de pH pour les lixiviats des terres plantées en ray-grass+trèfle et en luzerne se situent entre les valeurs présentées. Les écart-types sont inférieurs à la taille des marques.

Figure 61 : Inhibition de la germination du trèfle violet par les lixiviats des terres d'AUG G1 (1600 mg HAP kg⁻¹ terre) et G2 (3500 mg HAP kg⁻¹ terre), plantées en ray-grass ou non plantées.

Figure 62 : Pluviométrie, volume d'eau percolé et quantité moyenne cumulée de 12 HAP exportés à partir des lysimètres de terre d'ancienne usine à gaz G1(1600 mg HAP kg⁻¹ terre) au cours des 2,5 ans du traitement.

Figure 63 : Pluviométrie, volume d'eau percolé et quantité moyenne cumulée de 12 HAP exportés à partir des lysimètres de terre d'ancienne usine à gaz G2 (3500 mg HAP kg⁻¹ terre) au cours des 2,5 ans du traitement.

Figure 64 : Evolution de la teneur en phénanthrène extractible, représentatif des HAP de quatre cycles et moins, au cours du temps selon les modalités de traitement des lysimètres. Lettres : analyse de variance, n=3 et p=0,05, toutes modalités confondues.

Figure 65 : Evolution de la teneur en benzo[a]pyrène extractible, représentatif des HAP de cinq cycles au cours du temps selon les modalités de traitement des lysimètres.

Figure 66 : Evolution de la teneur en dibenz[a,h]anthracène extractible, représentatif du troisième type de comportement présenté par les 16 HAP au cours du temps selon les modalités de traitement des lysimètres. Lettres : analyse de variance toutes modalités confondues, n=3 et p=0,05.

Liste des tableaux

Introduction générale

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des 16 HAP EPA (d'après MacKay *et al.*, 1991). ND, non disponible; Kow : coefficient de partage octanol-eau; Koc : coefficient d'adsorption aux matières organiques.

Chapitre 1

Tableau 2 : Analyse granulométrique et caractéristiques physico-chimiques de la terre agricole et des trois terres d'ancienne usine à gaz utilisées au cours des tests de germination, de croissance ou de développement racinaire de différentes espèces végétales.

Tableau 3 : Teneur en HAP du goudron d'ancienne usine à gaz utilisé (moyenne de 3 analyses \pm écart-type).

Tableau 4 : Espèces végétales "sauvages" utilisées au cours des tests de germination.

Tableau 5 : Espèces végétales cultivées utilisées pour les tests de germination, de croissance et de développement racinaire.

Tableau 6 : Description des différents traitements mis en place lors du remplissage des rhizotrons.

Tableau 7 : Inhibition de la germination des espèces végétales cultivées en présence de terres d'anciennes usines à gaz G1 et G2 par rapport à la terre agricole témoin sans HAP.

Tableau 8 : Pourcentage de graines germées après 1 jour de contact avec la solution témoin sans HAP ou les solutions aqueuses saturées en naphthalène, phénanthrène, fluoranthène, chrysène ou benzo[a]pyrène.

Tableau 9 : Caractérisation de la croissance des plantules d'orge et de colza cultivées en présence de différentes concentrations de goudron et sur de la terre agricole sans goudron.

Tableau 10 : Matière fraîche aérienne (MF_{feuille}), racinaire (MF_{rac}) et rapport de la biomasse aérienne à la biomasse racinaire après culture de ray-grass sur les rhizotrons pendant 1 mois : effet de la modalité de remplissage.

Chapitre 2

Tableau 11 : Répartition de la radioactivité* dans les différents compartiments du système au cours de la croissance des plantules de maïs en présence de phénanthrène marqué au ^{14}C . Résultats exprimés en % de la radioactivité introduite.

Tableau 12 : Teneur en produits radioactifs dans les différentes parties des plantules de maïs ayant poussé en présence de phénanthrène marqué au ^{14}C dans la solution nutritive (n=4). Résultats exprimés en μg équivalent phénanthrène g^{-1} MS.

Tableau 13 : Répartition de la radioactivité retrouvée* dans les différents compartiments du système au cours de la croissance des plantules de maïs en présence de benzo[a]pyrène marqué au ^{14}C . Résultats exprimés en % de la radioactivité introduite.

Tableau 14 : Radioactivité retrouvée dans les parties végétales et dans l'extrait à l'eau des terres après 3, 7 et 14 jours de culture de plantules de maïs sur une terre agricole et une terre d'AUG à laquelle a été apporté du phénanthrène marqué au ^{14}C . Résultats exprimés en ng équivalent phénanthrène g^{-1} MS pour les végétaux et en ng équivalent phénanthrène g^{-1} terre pour l'extrait à l'eau.

Tableau 15 : Teneurs en produits radioactifs des différents compartiments des plantes ayant poussé en présence de phénanthrène marqué au ^{14}C ou non (témoin) pendant 16 jours. Résultats exprimés en ng équivalent phénanthrène g^{-1} MS.

Tableau 16 : Teneurs des différents compartiments des plantes ayant poussé en présence de benzo[a]pyrène marqué au ^{14}C ou non (témoin) pendant 16 jours. Résultats exprimés en ng équivalent benzo[a]pyrène g^{-1} MS.

Chapitre 3

Tableau 17 : Caractéristiques granulométriques et propriétés physico-chimiques de la terre G3.

Tableau 18 : Espèces végétales utilisées dans l'ensemble des expériences du chapitre 3.

Tableau 19 : Evolution du rapport de la biomasse aérienne sèche à la biomasse racinaire sèche du ray-grass au cours d'une culture de 6 mois en vases de végétation de volume réduit.

Tableau 20 : Taux journalier de dissipation des HAP purs dans la terre agricole plantée (ou non plantée) en ray-grass . Résultats exprimés en mg kg^{-1} terre j^{-1} .

Tableau 21 : Evolution de la teneur en HAP de la terre d'AUG G1 plantée ou non en ray-grass au cours des 6 mois de mise en culture en vases de végétation.

Tableau 22 : Biomasse racinaire récoltée à 180 jours dans les différentes couches des colonnes de terre d'ancienne usine à gaz plantées en brome, dactyle, fétuque ou un mélange des 3 espèces. Résultats exprimés en g MS.

Tableau 23 : Coefficients Kf des terres de surface et de profondeur, au début et à la fin de l'expérience. Cas des colonnes témoin et des colonnes plantées avec le mélange d'espèces.

Tableau 24 : Biomasse aérienne fraîche produite par les différentes espèces végétales au cours des trois saisons de végétation (1998, 1999, 2000). Résultats exprimés en g MS par lysimètre plus ou moins l'écart-type (n=3).

Tableau 25: Teneur en HAP (mg kg^{-1}) des terres des lysimètres en début et fin de traitement.

Liste des photographies

Chapitre 1

Photographie 1 : Vue de la végétation sur un site d'ancienne usine à gaz.

Photographie 2 : Disposition des rhizotrons sur leur support dans la serre.

Photographie 3 : Développement racinaire du ray-grass sur un rhizotron de terre agricole homogène.

Photographie 4 : Développement racinaire du ray-grass sur un rhizotron de terre AUG G1 homogène.

Photographie 5 : Développement racinaire du ray-grass au voisinage d'une inclusion de terre d'AUG G2 dans la terre agricole.

Chapitre 2

Photographie 6 : Dispositif expérimental mis en place pour l'étude du transfert du phénanthrène et du benzo[a]pyrène à partir d'un sol vers les parties aériennes de plantules de maïs, en enceintes fermées (d'après Scheunert *et al.*, 1986).

Chapitre 3

Photographie 7 : Dispositif de lysimètres

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur AMBLES André, Professeur, Faculté des Sciences, Poitiers

Monsieur OUDOT Jean, Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Mademoiselle HENNER Pascale

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**« Phytoremédiation appliquée au traitement de sols contaminés par les hydrocarbures
aromatiques polycycliques »**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

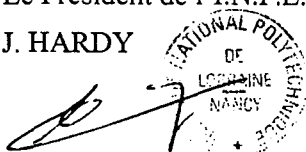
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **SCIENCES AGRONOMIQUES** »

Fait à Vandoeuvre, le 11 décembre 2000

Le Président de l'I.N.P.L.,

J. HARDY



Résumé

Dans le cadre de la réhabilitation des sols contaminés par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) comme les sols d'ancienne usine à gaz (AUG), l'utilisation de plantes et de leur microflore associée pour diminuer la concentration des polluants, a été étudiée selon trois axes. Tout d'abord, l'effet de différentes matrices contaminées par des HAP sur la germination, la croissance et le développement racinaire de diverses espèces a été examiné grâce à des tests culturaux de courte durée. Dans un second temps, le transfert de HAP vers les parties aériennes a été évalué à l'aide de marqueurs biologiques. Enfin, la dissipation des HAP dans la rhizosphère a été étudiée en dispositifs expérimentaux allant des vases de végétation placés en conditions contrôlées à un dispositif pilote de micro-parcelles en conditions climatiques naturelles. Les diverses espèces végétales tolèrent des niveaux de contamination élevés. La sensibilité des plantes aux terres d'ancienne usine à gaz dépend principalement de la présence de composés volatiles. Le vieillissement des terres diminue la phytotoxicité et permet le développement du couvert végétal. Toutefois, des modifications morphologiques et physiologiques sont mises en évidence au niveau du système racinaire et des parties aériennes. L'intensité du transfert de HAP, très limité à partir du sol, est inversement proportionnelle au poids moléculaire de la molécule et à l'âge de la plante. L'évolution de la teneur en HAP dans les divers dispositifs peut être modélisée à partir de 3 compartiments dans lesquels sont répartis qualitativement les polluants : compartiments labile, relativement résistant et très résistant. Sur une ou plusieurs saisons de végétation, quelles que soient les conditions, la plante n'a pas eu d'effet mesurable sur la diminution de la teneur en HAP. Cet effet n'est vraisemblablement pas mesurable parce qu'il n'excède pas la variabilité analytique due à l'hétérogénéité des matériaux considérés.

Phytoremediation applied to the treatment of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soils

This work deals with the general goal of soil remediation, with the example of former manufactured gas plant (MGP) soils. The use of green plants and their associated microflora to decrease the pollutant content of contaminated soils, was studied through 3 different topics. Firstly, the impact of various PAH-contaminated matrices on the germination, growth and root development of different plant species was studied with the help of rapid growth tests. Secondly, PAHs translocation to aerial parts was analysed with the help of biological markers. Then, PAHs dissipation in the rhizosphere of plants was investigated with the help of various experimental apparatus, from pots used in controlled parameters to an outdoor experiment of lysimeters. Plants tolerate high levels of soil contamination. Sensibility of growth parameters to MGP soils depends of the presence of phytotoxic volatile compounds. These compounds are dissipated during aging of soils, allowing the development of vegetation. Besides, morphological and physiological changes appear on the root and aerial parts of the plants in the presence of contamination. The uptake of PAH by plants decreases with the increase of both molecular weight of the molecule and the age of the plant. Uptake of PAH is highly limited by the presence of soil constituents. The dissipation of PAHs in the rhizosphere can be modeled through the existence of 3 organic compartments, in which PAHs are distributed : labile, moderately resistant and highly resistant compartment. Whatever the conditions or the number of growth periods considered, plants didn't exhibit any measurable effect on the decrease of PAHs. This lack of measurable effect is probably a consequence of analytical variability on PAHs content analysis, due to soil heterogeneity.

Discipline : Sciences Agronomiques

Mots-clés : hydrocarbures aromatiques polycycliques-phytoremediation-rhizosphère-relations sol/plante/microorganismes-sites d'ancienne usine à gaz

Laboratoire Sols et Environnement, ENSAIA-INRA-INPL, BP 172, 2 av. de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-Lès-Nancy cedex, France.