



HAL
open science

Variabilité spatio-temporelle des HAP et des communautés microbiennes dans la rhizosphère d'un sol historiquement contaminé

Amélia Bourceret

► **To cite this version:**

Amélia Bourceret. Variabilité spatio-temporelle des HAP et des communautés microbiennes dans la rhizosphère d'un sol historiquement contaminé. Autre. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0009 . tel-01754573

HAL Id: tel-01754573

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754573>

Submitted on 30 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>



Université de Lorraine

École doctorale Ressources Procédés Produits Environnement

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux

UMR 7360 CNRS – Université de Lorraine

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine en Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

Variabilité spatio-temporelle des HAP et des communautés microbiennes dans la rhizosphère d'un sol historiquement contaminé

par Amélia BOURCERET

Composition du jury :

M ^{me} Wafa ACHOUAK <i>DR, CNRS, CEA, Cadarache</i>	Rapportrice
M. Fabrice MARTIN-LAURENT <i>DR, INRA, Agroécologie, Dijon</i>	Rapporteur
M ^{me} Cristiana CRAVO-LAUREAU <i>MCf, Université de Pau et des Pays de l'Adour, IPREM, Pau</i>	Examinatrice
M. Jean-Louis MOREL <i>Pr, Université de Lorraine, LSE Vandoeuvre-lès Nancy</i>	Examineur
M ^{me} Aurélie CEBRON <i>CR, CNRS, LIEC, Vandoeuvre-lès-Nancy</i>	Co-directrice de thèse
M ^{me} Corinne LEYVAL <i>DR, CNRS, LIEC, Vandoeuvre-lès-Nancy</i>	Directrice de thèse

Soutenance publique le 8 janvier 2016

A mon père,

Remerciements



Préparer cette thèse a été une expérience très enrichissante, tant d'un point de vue professionnel que personnel. Ce travail a été facilité grâce à de nombreuses interactions avec différentes personnes qui ont contribué à semer dans cette thèse un peu, je dois l'avouer, de *rhizos-féerie* (ca y est, il est placé !).

Tout d'abord je tenais à remercier les membres de mon jury, Mme Wafa Achouak, M. Fabrice Martin-Laurent, Mme Cristiana Cravo-Laureau, et M. Jean-Louis Morel pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Ma thèse a débuté au LIMOS puis s'est poursuivie au LIEC, merci à M. Fabien Thomas, directeur du LIEC et M. Christian Mustin, directeur adjoint du site Aiguillettes, qui m'a accueilli. Merci également à mes financeurs, l'Université de Lorraine, le pôle OTELo, et le projet de l'ANR RhizOrg, auxquels sont rattachés mes travaux de thèse.

Un grand merci à ma directrice de thèse, Corinne Leyval, pour son encadrement, ses conseils son enthousiasme et ses encouragements tout au long de cette thèse. Un merci immense et très ému à Aurélie Cébron, ma co-directrice de thèse. Et dire que nous aurions pu frôler la non-rencontre ... C'est un très grand plaisir et une grande fierté d'avoir été associée à ce projet. Merci pour ta bienveillance, nos échanges et ton aide au quotidien. Merci à vous deux pour votre confiance et votre soutien dans les moments les plus difficiles de cette thèse. Merci à Chantal de Fouquet pour sa collaboration au projet. Lorsque l'écologie microbienne rencontre les géostatistiques, ce n'est pas toujours simple mais cette expérience interdisciplinaire a été pour moi très enrichissante et intéressante, alors merci Chantal pour le temps fourni.

Il me tient à cœur de remercier toutes les personnes qui ont été impliquées, qui ont donné du temps et de l'énergie à ce travail de thèse. Merci à François Thomas (dit « Mitch »), Post-Doc associé à RhizOrg, avec qui je pense avoir formé the Team !!! C'était chouette de travailler ensemble. Merci pour tes coups de pouce et de boost ! Merci pour ton aide, notamment en bio-informatique, nos échanges, et les bons moments passés ensemble (toujours partante pour un tour de zodiac avec toi à Roscoff si l'occasion se présente). Un grand merci à David Billet, Maximilien Jeanvoine (stagiaire de M1) et Géraldine Kitzinger pour leur aide en chimie analytique et plus particulièrement pour les analyses de HAP, compte tenu du très grand nombre d'échantillons fournis. Merci David pour ta disponibilité et tes coups de main, notamment pour dompter ma nouvelle « meilleure amie » (l'ASEse)! Merci aux personnes du

centre INRA Nancy-Lorraine à Champenoux, Marc Buée et Emilie Tisserant, pour leur aide concernant les analyses de diversité fongique, ainsi qu'à Jacqueline Marchand pour les analyses de sucres. Merci à Pierre Faure et Catherine Lorgeoux (GéoRessources) pour leur expertise et analyse des HAP en GC-MS. Merci également à Geneviève Magnin, Christine Friry Paul Dessaint (stagiaire) et Florence Coste qui ont apporté leur aide au cours de ces travaux.

Je voudrais également remercier l'ensemble de mes collègues du LIEC, pour leur aide, coups de main, bons moments passés ensemble au laboratoire et en dehors, pauses déjeuners, gouters festifs de 17h et WD vosgiens, qui ont fait de ces trois années quelques choses de juste inoubliable, que l'on a pas envie de quitter... et j'ai déjà la larme à l'œil...Merci à Titi, mon compère de bureau, toujours prévenant et de bon conseil, ainsi qu'à sa petite famille, pour les bons moments conviviaux au coin du feu. Merci à Marie, qui m'a fait découvrir Nancy et a facilité mon intégration dans le labo à mon arrivée et merci à Marga pour ces échanges très intéressants et les bons moments lors de son séjour dans le labo. Un grand merci à l'ensemble de mes collègues thésards !!! Bob (déjà en 2^{ème} année de thèse qui l'aurait cru ?!), Romain (Roro, merci pour les coups de main au labo et en tous genres), Charlotte et Robin, Tic et Tac (Dimitri et Johanne), Quentinou, Aurélie, Fadi, Céline, Marine, Nicolas et Florian et merci aussi aux stagiaires, Sonia, Louis, Marina, Guillaume, avec qui j'ai passé de bons moments au labo et en dehors. Merci aussi à mes collègues permanents Cécile, Caroline, Sylvie, Damien (vive les kakis !!!), Patrick, Asfaw, Anne, Alexis, Hervé, Laurence et Coralie pour leur sympathie au quotidien ! Merci à mes collègues des équipes DynAMic et de l'UR AFPA, avec qui j'ai mené des enseignements dans la bonne humeur pendant mes 3 ans de thèse, Chloé, Virginie, Magali, Stéphane et Laurence.

De façon plus personnelle, je voudrais également remercier mes proches, qui ont suivi d'un peu plus loin ce travail mais qui ont tout de même « subi » toutes les histoires, rebondissements et anecdotes croustillantes sur les HAP, la luzerne, les rhizotrons, le chloroforme, l'ASEse... etc...!!! Tout d'abord merci à mes amis de Dijon, les Renés (Mika et Emilie), Elo, Emilie, Cindy et Camille, les topines (Manue, Ambre et Ophélie) pour leur présence. Merci à Lorrie, qui a préparé sa thèse en parallèle de la mienne et avec qui j'ai eu de nombreux échanges positifs d'entraide... Un merci également à la bande de Paris (Matt, Jeremie et Katy, Isma et Manue) pour leur soutien. Un grand merci à ma famille pour leurs encouragements et leur bienveillance. Un immense merci à ma mère pour la force et la

persévérance qu'elle m'a transmise pour réaliser ce travail (et Vive la Microbio !) Merci à mon frère, Alex, à Karim et à ma sœur, Mélissa, pour son écoute, et livraisons fréquentes de courage, d'esprit positif et d'énergie, par camion semi-remorque entier (et oui ça blague pas...) dès que le besoin s'en faisait sentir !!! Une tendre pensée pour mon père, avec le regret, parmi tant d'autre, de ne pouvoir te raconter la fin de cette histoire, merci pour tout.

Merci à Tola, mon compagnon de choc pendant ces trois ans de thèse, qui m'apporte une force et un soutien sans limite. Avec toi à mes côtés, pas de souci pour en écrire une deuxième ! (euh non c'était pour rire... !)

Et pour finir merci à cette thèse, pour tous les questionnements, réflexions, moments d'enthousiasme qu'elle a suscité, ce qu'elle m'a apporté scientifiquement et humainement, ainsi que la force qu'elle m'a donnée dans les moments difficiles.

Table des matières

Table des matières	1
Table des illustrations	5
Liste des abbréviations	15
Introduction générale	17
1. Synthèse bibliographique	21
1.1 Les microorganismes et leur diversité dans les sols	21
1.1.1 Les microorganismes dans les sols.....	21
1.1.2 Facteurs influençant la diversité microbienne dans les sols.....	23
1.2 Les microorganismes dans la rhizosphère	30
1.2.1 La rhizosphère : généralités.....	30
1.2.2 L'effet rhizosphère	31
1.2.3 Variabilité spatio-temporelle dans la rhizosphère	37
1.3 Les HAP dans les sols	40
1.3.1 Définition et origines.....	40
1.3.2 Caractéristiques physico-chimiques.....	40
1.3.3 Devenir des HAP dans les sols.....	43
1.4 La biodégradation des HAP.....	50
1.4.1 Dégradation anaérobie.....	51
1.4.2 Dégradation aérobie	52
1.4.3 Dégradation des HAP dans la rhizosphère	58
1.5 Objectifs de la thèse.....	65
2. Matériels et méthodes	71
2.1 Le sol et les parcelles.....	71
2.1.1 Historique	71
2.1.2 Les parcelles lysimétriques	71
2.2 Les microcosmes : Rhizotrons.....	74
2.2.1 Caractéristiques du sol	74
2.2.2 Recontamination du sol.....	74
2.2.3 Microcosmes utilisés pour l'étude de la variabilité spatiale.....	76
2.2.4 Microcosmes utilisés pour l'étude de la variabilité temporelle.....	78
2.3 Analyses.....	80
2.3.1 Caractérisation de la contamination en HAP	80
2.3.2 Analyse des paramètres de la rhizosphère : pH, teneurs en sucres, en acides organiques et en carbone organique dissous	81

2.3.3	Caractérisation des communautés microbiennes totales et actives	82
2.4	Analyse des données.....	87
2.4.1	Analyses bioinformatiques.....	87
2.4.2	Analyses statistiques	92
2.4.3	Analyses géostatistiques.....	93
3.	Mapping the centimeter-scale spatial variability of PAHs and microbial populations in the rhizosphere of two plants.....	101
3.1	Abstract.....	101
3.2	Introduction	102
3.3	Materials and Methods	104
3.3.1	Soil preparation	104
3.3.2	Rhizotron device and sampling.....	107
3.3.3	Analysis of total and available PAHs.....	108
3.3.4	DNA extraction	109
3.3.5	Real-time PCR quantification of fungal, bacterial and PAH-degrading bacterial communities	109
3.3.6	Statistical analyses.....	109
3.3.7	Geostatistical analysis	110
3.4	Results	111
3.4.1	Edaphic parameters and microbial community after 37 days	111
3.4.2	Spatial variability of PAH, microbial community and rhizosphere parameters	115
3.5	Discussion.....	120
3.5.1	Spatial gradients in the rhizosphere	120
3.5.2	Comparison of PAH concentrations and microbial abundance in two contrasted rhizospheres.....	121
3.6	Conclusion.....	123
3.7	Acknowledgments	123
4.	Plant species with contrasted rhizosphere gradients induce different shifts in multi-contaminated soil bacterial diversity.....	129
4.1	Abstract.....	129
4.2	Introduction	130
4.3	Materials and methods.....	132
4.3.1	Experimental device and sampling	132
4.3.2	Soil characteristics.....	132
4.3.3	DNA Extraction.....	132
4.3.4	PCR and pyrosequencing	133
4.3.5	Analysis of 16S rDNA sequences	133

4.3.6	Statistical analysis	134
4.4	Results	135
4.4.1	Modification of bacterial community over time	135
4.4.2	Plant species effect on the bacterial community	139
4.4.3	Depth structuration of bacterial community after 37 days	141
4.4.4	Beta diversity.....	142
4.5	Discussion.....	144
4.5.1	Bacterial community modification during incubation period	144
4.5.2	Plant species-specific effect on bacterial communities.....	146
4.5.3	Depth gradient of bacterial communities	147
4.6	Conclusion	148
4.7	Acknowledgments	149
5.	Rapid PAH degradation in alfalfa rhizosphere soil is linked to the dynamic of the PAH-degrading microbial community	155
5.1	Abstract.....	155
5.2	Introduction	156
5.3	Materials and Methods	158
5.3.1	Experimental device	158
5.3.2	pH and COD analyses	160
5.3.3	Quantification of total PAHs and pPAC and bioavailable PAHs	160
5.3.4	DNA/RNA extraction.....	161
5.3.5	Real-time PCR quantification	162
5.3.6	Statistical analyses.....	162
5.4	Results	162
5.4.1	Root biomass and length, humidity, pH and DOC.....	162
5.4.2	PAH and pPAC content.....	163
5.4.3	Active and total microbial communities	165
5.4.4	Multivariate analysis	167
5.5	Discussion.....	168
5.5.1	PAH dissipation over time	168
5.5.2	Plant effect.....	169
5.6	Conclusion	170
5.7	Acknowledgments	171
6.	The bacterial and fungal diversity of an aged PAH- and heavy metal-contaminated soil is affected by plant cover and edaphic parameters	177
6.1	Abstract.....	177
6.2	Introduction	178
6.3	Materials and methods.....	180

6.3.1	Site description and sample collection	180
6.3.2	DNA extraction	182
6.3.3	Assessment of fungal and bacterial abundance by real-time quantitative PCR.....	182
6.3.4	PCR and pyrosequencing	182
6.3.5	Analysis of 16S rRNA genes and ITS pyrosequencing data.....	183
6.3.6	Statistical analyses.....	184
6.4	Results	185
6.4.1	Evolution of soil characteristics with time and plant colonisation.....	185
6.4.2	Bacterial and fungal abundance	185
6.4.3	Bacterial and fungal richness and diversity.....	186
6.4.4	Modification of bacterial and fungal diversity over time.....	189
6.4.5	Modification of bacterial and fungal diversity with the presence of plant.....	190
6.4.6	Multivariate analysis	191
6.5	Discussion.....	194
6.5.1	Microbial diversity of the aged multi-contaminated NM soil.....	194
6.5.2	Impact of edaphic parameters on soil microbial diversity over time	195
6.5.3	Impact of vegetation on soil microbial abundance and diversity.....	197
6.6	Conclusion	199
6.7	Acknowledgements	199
7.	Discussion générale	203
7.1	Prise en compte de la variabilité spatiale : quelles échelles, quels dispositifs, quels résultats ?.....	203
7.2	Impact de l'espèce végétale sur les HAP et les communautés microbiennes dégradantes : un effet spatial ?	207
7.3	Variabilité temporelle de la dissipation des HAP et des communautés fonctionnelles dans la rhizosphère	209
	Conclusion générale	213
	Références	217
	Annexes chapitre 3	247
	Annexes chapitre 4	250
	Annexes chapitre 5	251
	Annexes chapitre 6	256

Table des illustrations

Figures

- Figure 1.1.** Différents paramètres impactant la diversité, l'abondance et l'activité des communautés microbiennes du sol. 22
- Figure 1.2.** Evolution de la biomasse microbienne en fonction de l'usage des sols, suite à une étude biogéographique menée à l'échelle de la France, dans le cadre du programme RMQS (Réseau de Mesure de la Qualité des Sols) (extrait de Plateforme Genosol INRA Dijon, GIS Sol -2012). 23
- Figure 1.3.** Evolution de la richesse microbienne (nombre de taxons microbiens) en fonction de l'usage des sols, en France (Extrait de Plateforme GenoSol – INRA UMR Agroécologie – GIS Sol 2015). 27
- Figure 1.4.** Changements des paramètres microbiens dans la rhizosphère (moyenne \pm sd), (d'après Kuzyakov et al. 2015). 31
- Figure 1.5.** Mécanismes impliqués dans l'effet rhizosphère. L'exsudation libre des métabolites primaires (MI) : sucres (su), des acides aminés (aa), des acides organiques (ao), qui sont minéralisés par les communautés microbiennes associées à la rhizosphère et des métabolites secondaires (MII), qui sont des molécules de signalisation pour l'établissement de symbiose (entre les microorganismes et les végétaux) et biosurfactantes. 32
- Figure 1.6.** Diversité de la morphologie racinaire de différentes espèces végétales retrouvées en sol sous-prairies (d'après McNear 2013). 35
- Figure 1.7.** Impact de l'espèce végétale sur la diversité bactérienne au niveau phylum (d'après Aleklett et al. 2015). 36
- Figure 1.8.** Variabilité spatio-temporelle des processus rhizosphériques qui entraînent des gradients de pH et d'exsudation avec la profondeur en fonction de l'âge racinaire (P: phosphore, N : azote, C : carbone). 39
- Figure 1.9.** Principaux mécanismes impliqués dans le devenir des HAP dans les sols. 43
- Figure 1.10.** Carte d'estimation par krigeage de la concentration en HAP sur un site finlandais (grille d'échantillonnage de 20 m x 80 m), contaminé au créosote, (concentration en ppm) (d'après Mukherjee et al. 2014). 44
- Figure 1.11.** Impact du temps sur l'extractibilité et la biodisponibilité des polluants organiques hydrophobes dans les sols, (d'après Semple et al. 2003). 45
- Figure 1.12.** Phénomène d'aging conduisant à une augmentation de la séquestration des HAP aux agrégats de sol au cours du temps. 47

Figure 1.13. Synthèse des principales voies de biodégradation des HAP légers en aérobiose et en anaérobiose, chez les bactéries et les champignons, (d'après Cerniglia et al. 1992, Peng et al. 2008 et Haritash et al. 2009).....	53
Figure 1.14. Les différentes voies de phytoremédiation des polluants dans les sols (MI : métabolites primaires, MII : métabolites secondaires (d'après Alagic et al. 2015).	59
Figure 1.15. Les différents modes d'actions de la rhizosphère sur la dégradation des HAP (d'après Alagic et al. 2015).	59
Figure 1.16. Variabilité spatio-temporelle du devenir des HAP dans les sols industriels sous couvert végétal.	65
Figure 2.1. Répartition des différents traitements sur les parcelles lysimétriques installées à Homécourt (54). Six différents traitements ont été réalisés à partir de la terre de Neuves-Maisons (NM) en 4 réplicats: Msm: luzerne mycorhizée par <i>Glomus mosseae</i> et <i>Glomus intraradices</i> , SV: végétation spontanée, BS: sol nu, NC: semis de plantes hyperaccumulatrices de métaux, MS: luzerne mycorhizée, TD: sol thermo-désorbé et planté de luzerne mycorhizée. Au cours de cette thèse, les deux conditions NM-Msm et NM-BS ont été étudiées uniquement sur les parcelles numérotées.	72
Figure 2.2. Schéma de l'expérience en rhizotron N°1. Dans deux rhizotrons différents, du ray-grass et de la luzerne ont été cultivés sur de la terre de NM recontaminée. Après 37 jours de croissance en chambre phytotronique, les deux rhizotrons ont été échantillonnés selon une carte de prélèvement regroupant 56 échantillons (en vert) dont 7 réplicats par profondeur numérotés de 0 à 6 et 8 profondeurs nommées de A à H. Des mesures d'humidité ont été réalisées sur 24 échantillons (en gris). Des mesures de concentration en carbone organique dissous, sucres, pH et en HAP biodisponibles ont été réalisées sur 16 échantillons par dispositif (en bleu).	77
Figure 2.3. Schéma du dispositif expérimental N°2. Echantillonnage au cours du temps (T0, T1 (+6j), T2 (+12j), T3 (+16j), T4 (+22j), de deux dispositifs (planté avec de la luzerne et non planté), selon une carte de prélèvement standardisée regroupant 18 échantillons en vert (6 réplicats numérotés de 1 à 6 prélevés à 3 profondeurs (A: 3 cm, B: 9 cm, C: 15 cm). Des mesures d'humidité et de pH ont été réalisées sur 9 échantillons (en gris) et 4 prélèvements par hauteur ont été réalisés entre échantillons pour mesurer la teneur en COD, en acides organiques et en sucres.	79
Figure 2.4. Préparation des échantillons en vue de la réalisation du pyroséquençage 454/Roche GS-FLX Titanium.	86
Figure 2.5. Technologie du pyroséquençage 454 Roche (d'après http://454.com/index.asp). 87	
Figure 2.6. Synthèse des principales étapes de traitement des données brutes de pyroséquençage 454 selon les deux approches adoptées au cours des expérimentations in situ et en microcosmes.	88
Figure 2.7. Les différents composants du semi-variogramme, exemple d'un modèle pépitique avec palier (http://tice.agroparistech.fr).	95

Figure 3.1. Illustration of the rhizotron device. (A) Sampling map showing the 56 samples (in green). The 8 depths are labeled from A to H and the 7 replicates are labeled from 0 to 6. Twenty-four supplemental samples (in gray) were used for soil humidity measure measurements. On sixteen samples per device (in blue) further analyses of pH, bioavailable PAHs, carbohydrates and dissolved organic carbon (DOC) were performed. Pictures of alfalfa (B) and ryegrass (C) rhizotron devices after 37 days. 107

Figure 3.2. PAH contamination (sum of 16 US-EPA PAHs and sum of 15 available PAHs) over time (at T_0 and at T_{37}) and depending on the plant species (orange: alfalfa, Alf; green: ryegrass, Rye). Values are means and standard deviations of 15 and 56 replicates (PAHs), and 4 and 16 replicates (available PAHs) for the T_0 and T_{37} conditions, respectively. The effects of time and plant species were evaluated separately using Student t-tests ($p < 0.05$). Green and orange asterisks indicate significant changes in PAH concentrations between T_0 and T_{37} in the ryegrass and alfalfa rhizotrons, respectively. Black asterisks indicate significant differences in PAH concentrations between the ryegrass and alfalfa rhizotrons at T_{37} 113

Figure 3.3. Abundance values (A) and percentages (B) (relative to 16S rDNA) of fungal, bacterial and PAH-degrading bacterial communities over time (at T_0 and at T_{37}) and depending on the plant species (orange: alfalfa, Alf; green: ryegrass, Rye). Values are means and standard deviations of 3 and 56 replicates for T_0 and T_{37} , respectively. The effects of time and plant species were evaluated separately using Student t-tests ($p < 0.05$). Green and orange asterisks indicate significant changes in microbial community percentage or abundance between T_0 and T_{37} in the ryegrass and alfalfa rhizotron, respectively. Black asterisks indicate significant changes in microbial community percentage or abundance between the two plants at T_{37} 114

Figure 3.4. Principal component analysis (PCA) and correlation circle generated using depth, percentages (gene abundance relative to 16S rRNA gene abundance) of fungal (18S/16S) and PAH-degrading bacterial (% PAH-RHD $_{\alpha}$ GN and GP) communities, root biomass (Root B.), weight of rhizosphere soil, sum of 16 (US-EPA) PAH concentrations (16 PAHs), 2-3-ring PAHs (naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene), 4-ring PAHs (fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chryzene), 5-6-ring PAHs (benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene) for the 56 samples (noted A to H for the 8 depths and 0 to 6 for the 7 replicates, as shown in Figure 1) from the alfalfa (orange) and ryegrass (green) rhizotrons. 115

Figure 3.5. Relationship between percentages of fungal (18S/16S) and PAH-degrading bacterial communities (PAH-RHD $_{\alpha}$ GN and GP/16S), sum of 16 PAH concentrations, weight of rhizosphere soil, root biomass, and rhizotron depth for alfalfa (orange) and ryegrass (green). Correlation clouds show the data from the 56 soil samples (diamonds). Mean values ($n=7$) per class (squares and full line) and class standard deviations (triangles and dotted lines) are represented. For each relationship, the Spearman's correlation coefficient (r) and the non-linear correlation coefficient (η^2) were calculated. 117

Figure 3.6. Semivariograms and kriging maps modeling the spatial distribution of 5 different parameters measured from the alfalfa (left) and ryegrass (right) rhizotrons. Data after 37 days for: (A and B) fungal communities (percentages of 18S rRNA genes relative to 16S rRNA genes), (C to F) PAH-degrading bacterial communities (percentages of PAH-RHD_α GN and PAH-RHD_α GP genes relative to 16S rRNA genes), (G and H) sum of 16 (US-EPA) PAHs, and (I and J) root biomass. Samples (circles) and fitted semivariograms (lines) are shown. Semivariance was plotted versus distances between samples, and for each parameter different models were used to fit the data (spherical model with nugget effect: alfalfa: sum of 16 PAHs, 18S/16S, PAH-RHD_α GP/16S; ryegrass: sum of 16 PAHs, PAH-RHD_α GN/16S; spherical model, order-1 G.C., with nugget effect: alfalfa: PAH-RHD_α GN/16S; order-1 G.C model with nugget effect: ryegrass: 18S/16S; power model with nugget effect: ryegrass: root biomass; linear model with nugget effect: alfalfa: root biomass. A sample variogram corresponding to PAH-RHD_α GP/16S data was fitted with the more general model of intrinsic random first order function. No model fitted the sample variogram for this variable. Contour maps (10 mm mesh) derived from values interpolated by punctual kriging of 56 samples. (N/A: non-available data). 119

Figure 4.1. Relative abundance of the dominant bacterial phyla (represented by at least 3 sequences) at T0 and after 37 days (T37), for alfalfa (Alf) and ryegrass (Rye) at 4 depths (2, 8, 14 and 20 cm from the surface of soil). Proteobacteria were represented at the class level for better taxonomic resolution. Means ± SD, n=3 for T0 samples and n=4 for T37 samples. The group named other phyla includes: MVP-21, OD1, SBR1093, TM6, TM7. 137

Figure 4.2. OTUs showing significant change in relative abundance between T0 and T37 for each plant. Data were compared using Welch's t-tests with Benjamini-Hochberg correction of p-value (q-value). Differences were considered significant if q<0.05 and filtered for effect size (difference between proportions >1 or ratio between proportions >4). Means ± SD over the entire depth profile (n=3 and n=16 for T0 and T37, respectively). Values at T0 (left side) were compared to T37 (right side) for each plant and asterisks denote the time with highest relative abundance (green, ryegrass; orange; alfalfa; *, q<0.05; **q<0.01; ***, q<0.001). 138

Figure 4.3. OTUs showing significant change in relative abundance between ryegrass and alfalfa at T37. Data were compared using Welch's t-tests with Benjamini-Hochberg correction of p-value (q-value). Differences were considered significant if q<0.05 and filtered for effect size (difference between proportions >1 or ratio between proportions >4). Means ± SD over the entire depth profile (n=16). Values at T37 were compared between plant and asterisks denote the plant with highest relative abundance (green, ryegrass; orange; alfalfa; *, q<0.05; **q<0.01; ***, q<0.001). 140

Figure 4.4. OTUs discriminating the four studied depth and showing the spatial variability of the bacterial community in alfalfa condition. A Tukey-Kramer ANOVA with Benjamini-Hochberg correction of p-value (q-value) allowed to identify OTUs with significant (considering q<0.05, and effect size >0.26) differences in the relative abundance depending on rhizotron depth (-2, -8, -14 and -20 cm from the surface of soil). Means ± SD (n=4). For each OTU, letters denote groups with significant differences in relative abundance. 142

- Figure 4.5.** Venn diagrams comparing bacterial communities composition (OTU level) between T0 and T37 conditions for both plant species (T0 including T0_alf and T0_rye) and T37_alf and T37_rye. The shared OTUs between the three studied conditions were calculated after pooling replicate samples using the QIIME1.8.0 pipeline..... 143
- Figure 4.6.** Non-metric multidimensional scaling ordination (nMDS) representing the impact of environmental factors (black arrow: edaphic parameters in black, sugar content in grey, rhizospheric parameters in green and bacterial abundance in red) on bacterial diversity in alfalfa (circle) and ryegrass (triangle) condition at 4 depths (blue gradients) after 37 days of plant growth. Each arrow represents one environmental parameter significantly correlated to the bacterial diversity ($p < 0.05$). 144
- Figure 5.1.** Illustration of the experimental device over time. (A) The device was composed of a mini-rhizotron (in orange) fitting in a corresponding rhizotron (in black). At the depth 3 cm, six samples (in green) were collected, 3 samples (in gray) were used for soil humidity measurements, and 4 supplemental samples collected between green locations allowed quantification of dissolved organic carbon (DOC). (B) Pictures of alfalfa rhizotron devices (B) after 6 (T1), 12 (T2), 16 (T3) and 22 (T4) days of plant growth. 159
- Figure 5.2.** Soil and root characteristics over time. Dry root biomass and length (A), pH (B) and dissolved organic carbon (DOC) (C) after 6 (T1), 12 (T2), 16 (T3) and 22 days (T4) in planted (orange) and unplanted (brown) soils. Means ($n=6$ for root biomass and length, and $n=4$ for pH and DOC) and standard errors. Letters indicate significant ($p < 0.05$) effects of time and presence of plant evaluated by using two-way ANOVA and Neuman Keuls *post Hoc* test. 163
- Figure 5.3.** PAH concentration (sum of 13 US-EPA PAHs) after 6, 12, 16 and 22 days in planted (green) and unplanted (brown) soils. Box plots show value variability and means (black cross), $n=24$ (for T0 samples) and $n=6$ (T1 to T4 samples). Dashed line indicate mean of PAH concentration in the NM soil before spiking. Black asterisks indicate significant differences between planted and unplanted soil (Student t test, $p < 0.05$) and letters indicate significant differences depending on time (ANOVA). 164
- Figure 5.4.** Nitrogenous and oxygenated pPAC concentration over time (at T0 and T1) in planted (green) and unplanted (brown) soils. Values are means ($n=6$) and standard errors. Letters indicate significant differences in pPAC concentrations between T0 and T1, and depending on presence of plant (one-way ANOVA). 165
- Figure 5.5.** Abundance values of genes (A) and transcripts (B) and ratio of transcripts relative to their corresponding genes (C) for fungal 18S rRNA, bacterial 16S rRNA and PAH-degrading bacterial communities after 6, 12, 16 and 22 days in alfalfa planted (green) and unplanted (brown) soils. Values are means and standard deviations of 3 replicates (T0) and 6 replicates for T1 to T4. The effect of time was evaluated for each condition (planted, unplanted) by using one-way ANOVA ($p < 0.05$) and presence of plant was evaluated between T1 and T4 by using two-way ANOVA ($p < 0.05$) followed by Neuman Keuls *post Hoc* test. In A and B, different letters indicate significant changes in microbial community abundance depending on time for each condition, black asterisks indicate plant effect. In C, letters indicate cross effect of plant and time on the ratio of transcript relative to gene copies. 166

Figure 5.6. Principal component analysis (PCA) and correlation circle generated using time, DOC, pH, percentage (18S rRNA, and PAH-RHD_α GN and GP relative to 16S rRNA genes and transcripts) of total (gDNA) and active (cDNA) communities, root biomass (RootB) and length (RootL), sum of 13 PAH concentrations, 2-3-ring PAHs (fluorene, phenanthrene, anthracene), 4-ring PAHs (fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chryzene), 5-6-ring PAHs (benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene) for the 24 samples (4 replicates (A2 to A5) for each sampling time, T0, T1, T2, T3, T4 corresponding to 0, 6, 12,16 and 22 days) from the alfalfa planted (L) (green) and unplanted (NP) (black) rhizotrons..... 168

Figure 6.1. Abundance of fungal and bacterial (18S and 16S rRNA gene copy numbers) communities and alfalfa biomass over time (T0: September 2005, T4: September 2007 and T12: September 2011) for the two BS (bare soil) and Msm (planted with *Medicago sativa* and inoculated with mycorrhizal fungi) treatments. Different letters indicate significant differences among plots (p<0.05) resulting from a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Neuman-Keuls multiple comparison test ; abc, AB and A'B' refer respectively to statistics on 16S rRNA gene copy numbers. g of dry weight soil⁻¹, 18S rRNA gene copy numbers. g of dry weight soil⁻¹ and alfalfa biomass. 185

Figure 6.2. Relative abundance of the dominant (represented by more than 10 sequences) fungal and bacterial phyla in the six conditions (means of 3 replicates). 188

Figure 6.3. Clustering analysis generating double dendrograms (vertically: OTUs dendrogram and horizontally: sample conditions dendrogram) and heat map representation reflecting data values of the most abundant (>2% in at least one sample) bacterial and fungal OTUs in the six conditions (affiliation at 97% similarity). The relative abundance of 24 bacterial and 37 fungal OTUs were normalised (z-score) to compare studied conditions (3 replicates per condition)..... 189

Figure 6.4. Canonical correspondence analysis (CCA) ordination of bacterial (in green) and fungal (in blue) taxa (relative abundance of the dominant orders represented by more than 10 sequences), and environmental variables (abundance of fungal 18S and bacterial 16S rRNA gene copy numbers, biomass of dry alfalfa and edaphic characteristics (in red), showing the relationships between the different plots and sampling dates (3 replicates of the 6 conditions, in black bold type). Numbers in Italic correspond to the quantity of OTUs that belong to the taxon. Fungal and bacterial orders: *Acidi.:* *Acidimicrobiales*, *Acidithio.:* *Acidithiobacillales*, *Actinomyc.:* *Actinomycetales*, *Altero.:* *Alteromonadales*, *Bacill.:* *Bacillales*, *Bdello.:* *Bdellovibrionales*, *Burkhol.:* *Burkholderiales*, *Caldi.:* *Caldilineales*, *Capno.:* *Capnodiales*, *Caulo.:* *Caulobacterales*, *Chaetos.:* *Chaetosphaeriales*, *Chlamy.:* *Chlamydiales*, *Chroma.:* *Chromatiales*, *Clostri.:* *Clostridiales*, *Dehalo.:* *Dehalococcoidales*, *Desulfur.:* *Desulfuromonadales*, *Elusi.:* *Elusimicrobiales*, *Euro.:* *Eurotiales*, *Euzeb.:* *Euzebyales*, *Flavo.:* *Flavobacteriales*, *Gemma.:* *Gemmatimonadales*, *Helot.:* *Helotiales*, *Hydrogeno.:* *Hydrogenophilales*, *Hypo.:* *Hypocreales*, *Lactob.:* *Lactobacillales*, *Legion.:* *Legionellales*, *Methylo.:* *Methylococcales*, *Microasc.:* *Microascales*, *Mortier.:* *Mortierellales*, *Myxoc.:* *Myxococcales*, *Nitro.:* *Nitrospirales*, *Nitroso.:* *Nitrosomonadales*, *Oceano.:* *Oceanospirillales*, *Onyg.:* *Onygenales*, *Opitu.:* *Opitutales*, *Parvu.:* *Parvularculales*, *Pseudo.:* *Pseudomonadales*, *Punicei.:* *Puniceococcales*, *Rhizo.:* *Rhizobiales*, *Rhodo.:* *Rhodobacterales*, *Rhodocyc.:* *Rhodocyclales*, *Rhodospiri.:* *Rhodospirillales*, *Rickett.:*

Rickettsiales, Soliru.: Solirubrobacterales, Sphaero.: Sphaerobacterales, Sphingo.: Sphingomonadales, Sphingobacter.: Sphingobacteriales, Sporidio.: Sporidiobolales, Syntro.: Syntrophobacterales, Theleb.: Thelebolales, Thermo.: Thermoanaerobacterales, Thermoleo.: Thermoleophilales, Thiotric.: Thiotrichales, Treme.: Tremellales, Un. Acido_Gp1: Unclassified Acidobacteria_GP1, Un. Acido_Gp10: Unclassified Acidobacteria_GP10, Un. Acido_Gp16: Unclassified Acidobacteria_GP16, Un. Acido_Gp17: Unclassified Acidobacteria_GP17, Un. Acido_Gp3: Unclassified Acidobacteria_GP3, Un. Acido_Gp6: Unclassified Acidobacteria_GP6, Un. Acido_Gp7: Unclassified Acidobacteria_GP7, Un. Actino.: Unclassified Actinobacteria, Un. Bacteria.: Unclassified Bacteria, Un. Bacteroid.: Unclassified Bacteroidetes, Un. Basidio.: Unclassified Basidiomycota, Un. Chloro.: Unclassified Chloroflexi, Un. Firmi. Unclassified Firmicutes, Un. Fungi: Unclassified Fungi, Un. Glomero.: Unclassified Glomeromycota, Un. Hypocreo.: Unclassified Hypocreomycetidae, Un. ODI: Unclassified ODI, Un. Plancto.: Unclassified Planctomycetes, Un. Strepto.: Unclassified Streptophyta, Un. Thermo.: Unclassified Thermomicrobia, Un. α -proteo.: Unclassified Alphaproteobacteria, Un. γ -proteo.: Unclassified Gammaproteobacteria, Un. δ -proteo.: Unclassified Deltaproteobacteria, Xantho.: Xanthomonadales. Edaphic characteristics: extractable copper, iron, and zinc (Cu ext, Fe ext, and Zn ext, respectively), 16 PAHs (mg/Kg of dry weight soil)..... 194

Figure 7.1. Synthèse de la variabilité spatio-temporelle des HAP et des communautés microbiennes dans un sol industriel contaminé aux HAP, en présence ou non de plante, et dans la rhizosphère de deux espèces végétales différentes : le ray-grass et la luzerne. L'impact des différents paramètres est indiqué selon des échelles de temps différentes (semaine, mois, année), (nd : non déterminé, \uparrow : paramètre favorisé, \downarrow : paramètre ralenti, \boxtimes : effet présent, \boxminus : effet absent, \neq : effet contrasté)..... 205

Tableaux

Tableau 1.1. Exemples de composés constituant les exsudats racinaires, chez <i>Arabidopsis</i> (d'après Badri & Vivanco 2009).....	33
Tableau 1.2. Caractéristiques physico-chimiques des 16 HAP prioritaires (liste de l'US-EPA) (d'après Mackay et al. 1992).....	42
Tableau 2.1. Evolution au cours du temps (T0, T4, T12) des caractéristiques physico-chimiques et biologiques de la terre NM des parcelles lysimétriques, nue (BS) et plantée avec de la luzerne mycorhizée (Msm).....	73
Tableau 2.2. Caractéristiques physico-chimiques du lot de terre de NM utilisé au cours des deux expérimentations en rhizotron. L'analyse des propriétés physico-chimiques a été réalisée au laboratoire LAS-INRA (Arras, France).....	74
Tableau 2.3. Teneur en HAP de l'extrait organique complexe extrait de la terre de NM, lors de l'étude en rhizotron N°2.	75
Tableau 2.4. Caractéristiques des programmes et des amorces utilisées dans le cadre des PCR quantitatives en temps réel.	85

Tableau 2.5. Caractéristiques des programmes et des amorces utilisées dans le cadre des PCR pour le pyroséquençage 454 Roche.....	85
Tableau 2.6. Synthèse des différents indices de diversité, richesse et d'équitabilité calculés afin de caractériser les communautés microbiennes.	91
Tableau 2.7. Synthèse de l'ajustement des variogrammes expérimentaux par des modèles théoriques pour les différentes variables étudiées, selon les deux plantes utilisées.....	95
Tableau 2.8. Expression mathématique des différents modèles théoriques utilisés pour l'ajustement des variogrammes expérimentaux, avec C0 : effet pépète, C : pallier partiel, h : distance en cm, a : portée (d'après McBratney and Webster 1986).....	96

Tables

Table 3.1. Soil characteristics and PAH contamination. Granulometry, agronomic and chemical properties were measured at the LAS-INRA laboratory (Arras, France). Different letters indicate significant differences (Student t-test, $p < 0.05$) in total and available PAH concentrations before and after spiking.	106
Table 3.2. Soil characteristics and carbohydrate concentrations after 37 days of alfalfa (Alf) or ryegrass (Rye) growth, at four depths (2, 8, 14, and 20 cm from the surface of the rhizotron). Values are means and standard deviations of three and four replicates for humidity and other parameters, respectively. The effect of plant species was evaluated using Student t-tests ($p < 0.05$). The effect of depth was tested separately for each plant species after 37 days using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparison test and letters indicate significant differences ($p < 0.05$).	112
Table 4.1. Bacterial richness and diversity estimators in soil planted with alfalfa (Alf) or ryegrass (Rye) before (T0) and after 37 days (T37) of growth, at four depths (2, 8, 14 and 20 cm from the surface of the rhizotron). OTUs were created with 97% sequence similarity (OTU ₉₇). Means \pm SD, n=3 (T0 samples) and 4 (T37 samples). The effects of time and plant species were evaluated using Student t-tests ($p < 0.05$). The effect of depth was tested (different letters (a, b, c) denote groups with significantly different values ($p < 0.05$)) separately for each plant species at 37 days using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparison test.	136
Table 4.2. Bacterial taxa showing significant effect of the plant species on relative abundance after 37 days, at the phylum, class and order levels. Mean \pm SD (n=16) over the entire depth profile. The effect of plant was evaluated using Welch's t-tests followed by Benjamini-Hochberg correction of the p-values. Significant taxa were defined based on stringent criteria: abundance (at least 3 sequences in one sample), corrected p-value ($p < 0.05$) and effect size (difference between proportions > 1 or ratio of proportions > 4). For each taxon, values in boldface denote the group with highest relative abundance.	139
Table 6.1. Summary of the soil characteristics for the six conditions (mean and standard deviation, n=3). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparison test (nd: not determined).	181

Table 6.2. Pyrosequencing data characteristics, and richness and diversity estimators (3% cutoff) of the bacterial and fungal communities in the six different conditions (means and standard deviations, n=3): BS (Bare soil) and Msm (planted with *Medicago sativa* and inoculated with mycorrhizal fungi) at three time-points (T0: setting up, T4: after 2 years and T12: after 6 years). We created OTUs based on 97% sequence similarity (OTU₉₇) and randomly subsampled 16S rRNA genes and ITS data to 18,100 and 9,100 reads *per* sample. A two-way analysis of variance (ANOVA, p<0.05) followed by Newman-Keuls multiple comparison test was performed on richness and diversity estimator data to determine statistical differences (lowercase) between treatments. 187

Annexes

Annexe 3.1. Pearson’s correlation matrix between soil properties. Values in bold correspond to significant correlation between variables (p<0.05). 247

Annexe 3.2. Comparison of different mapping representations of the percentage of PAH-RHD_α GP relative to 16S rDNA variable for ryegrass. A: measured data point, B: data point estimated by nearest neighboring, C: kriging estimation, F: estimation by inverse distances, with 1/D³. N/A: non-available data. 248

Annexe 3.3. Relationship between percentages of fungal communities (18S/16S), PAH-degrading bacterial communities (PAH-RHD_α GN and GP/16S), the sum of 16 PAH concentrations, weight of rhizosphere soil and root biomass for alfalfa (orange) and ryegrass (green). Correlation clouds show the data from the 56 soil samples (diamonds). Mean values (n=7) per class (squares and full line) and class standard deviations (triangles and dotted line) are represented. For each relationship, the Spearman’s correlation coefficient (r) and the non-linear correlation coefficient (η²) were calculated. 249

Annexe 4.1. Summary of chemical, rhizosphere and bacterial soil characteristics from (Bourceret et al. submitted). Means ± SD, (n=4 for pH, DOC, inositol, fructose and xylose values; and n=8 for PAH, root biomass, mass of rhizospheric soil and bacterial abundance). The effect of depth was tested separately for each plant species at 37 days using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparison test. The effect of plant species was evaluated using Student t-tests (p<0.05). Different letters (A, B, C) denote groups with significantly different values (p<0.05). 250

Annexe 5.1. Pearson’s correlation matrix between soil properties according to time. Values in bold correspond to significant correlation between variables (p<0.05). 251

Annexe 5.2. Root biomass and length, humidity and pH and dissolved organic carbon (DOC) as function of depth in alfalfa planted (green) and unplanted (brown) rhizotron after 22 days (T4). Correlation clouds show the data from the 18 (for root biomass), 9 (humidity) and 12 (pH and DOC) soil samples. Mean values (n=6 (root biomass), n=3 (humidity), n=4 (pH and DOC) per depth (squares and full line) and standard deviations (triangles and dotted lines) are represented. The effects of depth and presence of plant were evaluated by using two-way ANOVA (p<0.05). Different letters indicate significant differences between samples. 252

Annexe 5.3. PAH concentration (sum of 13 US-EPA PAHs) in alfalfa planted (green) and unplanted (brown) soil at 3 (A), 9, (B) and 15 (C) cm depths in the rhizotrons after 22 days (T4). Box plots show means (black cross), n=6. The effects of depth and presence of plant were evaluated by using two-way ANOVA ($p<0.05$).	253
Annexe 5.4. Abundance of fungal, bacterial and PAH-degrading bacterial communities in alfalfa planted (green) and unplanted (brown) soil at 3 (A), 9, (B) and 15 (C) cm depths in the rhizotrons after 22 days (T4) in total (gDNA) and active population (cDNA). Correlation clouds show the data from the 18 soil samples. Mean values (n=6) per depth (squares and full line) and depth standard deviations (triangles and dotted lines) are represented. The effects of depth and presence of plant were evaluated by using two-way ANOVA ($p<0.05$). Different letters indicate significant differences in microbial community abundance between planted and bare soil and different depths.	254
Annexe 5.5. Principal component analysis (PCA) and correlation circle generated using depth, DOC, pH, percentages (gene abundance relative to 16S rRNA gene abundance) of active (DNAc) and totale (DNAg) fungal (18S/16S) and PAH-degrading bacterial (% PAH-RHD _α GN and GP) communities, root biomass (RootB) and length (RootL), sum of 13 PAH concentrations, 2-3-ring PAHs (fluorene, phenanthrene, anthracene), 4-ring PAHs (fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chryzene), 5-6-ring PAHs (benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene) for the 12 samples (4 replicates per depth) from the alfalfa (L) (green) and bare soil (NP) (black) rhizotrons at 3 (A), 9, (B) and 15 (C) cm depths.	255
Annexe 6.1. Rarefaction curve representing the number of operational taxonomic units (OTUs) depending on the number of 16S rRNA genes (A) and ITS (B) sequences amplified from the six conditions. After OTU formation to 97% similarity, sub-sampling was performed to 18,100 and 9,100 sequences <i>per</i> sample for bacterial and fungal data respectively.....	256
Annexe 6.2. Affiliation at 97% similarity of the most abundant (>2% in at least one sample) bacterial and fungal OTUs in the six conditions (mean and standard deviation, n=3). Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Neuman-Keuls multiple comparison test to study the effect of plant cover and time on the most abundant bacterial (16S) and fungal (ITS) OTUs. Sections colored in dark grey / grey / light grey and white mean respectively that OTUs were significantly ($p<0.05$) favored at all time-points / favored at T4 / inhibited or not influenced by the plant cover or by time.....	257

Liste des abréviations

Aa	Acides aminés
ACC	Analyse Canonique des Correspondances
ACH	Analyse ascendante hiérarchique
ACP	Analyse en Composante Principale
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
Alf	Alfalfa
ANOVA	ANalysis Of VAriance
ANR	Agence Nationale de la Recherche
Ao	Acides organiques
BS	Bare soil
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Carbone
CCA	Canonical Correspondence Analysis
CEC	Capacité d'Echange Cationique
COD	Carbone Organique Dissous
CRE	Capacité de Rétention en Eau
DMSO	DiMethyl SulfOxide
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
DOC	Dissolved Organic Carbon
dw	dry weight
ES	Effect Size, Effet Statistique
ETM	Elément Trace Métallique
FEP	FluoroEthylene Propylene
GC-MS	Gaz Chromatography coupled to Mass Spectrometry
GISFI	Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles
GN	Gram-negative
GP	Gram-positive
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HM	Heavy Metal, métaux lourds
HPLC	High-Pressure Liquid Chromatography
ITS	Internal Transcribed Spacer
MI	Métabolites primaires
MID	Multiplex Identifier
MII	Métabolites secondaires
Msm	Medicago sativa, mychorisée
N	Azote
N-pPAC	Nitrogenated polar Polycyclic Aromatic compound
NM	Neuves-Maisons
nMDS	non-Metric multiDimensional Scaling
O-pPAC	Oxygenated polar Polycyclic Aromatic compound
OTELo	Observatoire Terre et Environnement de Lorraine
OTUs	Operational Taxonomic Units
P	Phosphore

PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbon
PAH-RHDa	PAH-ring hydroxylating dioxygenase
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMMA	PolyMéthacrylate de méthyle
pPAC	polar Polycyclic Aromatic Compound
PTFE	PolyTétraFluoroEthylène, Téflon
PTP	Pico Titer Plate
RDP	Ribosomal Data Project
RMQS	Réseau de Mesure de la Qualité des Sols
RNA	RiboNucleic Acid
Root B	Root biomass
Root L	Root length
Rye	Ryegrass
SIM	Single Ion Monitoring
SRA	Sequence Read Archive
Su	Sucres
TOC	Total Organique Carbone
US-EPA	Agence Américaine pour la Protection Environnementale
UV	Ultra Violet
WHC	Water Holding Capacity

Introduction générale

L'activité humaine, et notamment industrielle, induit de nombreuses perturbations pour les écosystèmes terrestres. A partir des années 80, le démantèlement des industries liées à l'exploitation du charbon, notamment en Lorraine, a conduit à la formation de nombreuses friches industrielles, dont le sol présente une multi-contamination par des métaux lourds (HM) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les HAP sont des polluants organiques persistants dans l'environnement qui peuvent présenter une toxicité pour les organismes de par leurs propriétés cancérigènes.

Dans un souci de réhabiliter ces sites historiquement contaminés, différentes stratégies ont été mises en œuvre pour traiter la pollution, allant du traitement chimique et thermique au traitement biologique. D'abord utilisée pour remédier à la contamination métallique, l'utilisation des plantes pour stimuler la biodégradation microbienne (rhizoremédiation) des polluants organiques, et notamment des HAP, a été envisagée. Cependant, la compréhension des mécanismes impliqués n'est pas suffisante pour mettre en œuvre cette technologie de façon efficace sur le terrain car les études précédentes ont montré des efficacités contrastées. En effet, sur site la pollution est hétérogène et la dynamique des polluants, notamment l'évolution de leur biodisponibilité dans le temps, rend difficile la modélisation des processus de biodégradation des HAP. Par ailleurs, la mise en place d'un couvert végétal induit une variabilité temporelle et spatiale de l'activité et de la diversité des populations microbiennes dans ces sols pollués, complexifiant les processus. Ainsi, ce travail de thèse propose de s'intéresser à la variabilité spatio-temporelle des HAP et des communautés microbiennes dans la rhizosphère d'un sol historiquement contaminé. Ce travail, rattaché à l'ANR RhizOrg (« Organisation de la communauté microbienne et devenir des polluants dans la rhizosphère » ANR-13-JSV7-0007, 2013-2017), a été réalisé au sein du LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux). Il s'intègre dans une thématique au cœur du laboratoire sur l'écodynamique et l'écotoxicité des contaminants et vient dans la continuité de travaux précédents qui avaient montré le rôle des microorganismes de la rhizosphère dans la dissipation des HAP, mais qui n'avaient pas abordé cette question de la variabilité spatiale et temporelle des processus. Ce travail a bénéficié d'un soutien du GISFI (Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Fiches Industrielles) qui regroupe 12 laboratoires lorrains de recherche et qui a pour objectif de répondre à des questions en lien avec la pollution industrielle par des approches interdisciplinaires. Le GISFI a contribué à ce travail en donnant accès à des

dispositifs mis en place sur la station expérimentale d'Homécourt (54), et en mettant à disposition du sol contaminé, provenant de la friche industrielle de Neuves-Maisons (54).

Ce manuscrit de thèse est composé de sept chapitres. Un premier chapitre correspond à une synthèse bibliographique présentant la diversité microbienne dans les sols et les différents facteurs l'impactant. L'influence de la présence de plante et les processus rhizosphériques y sont présentés, ainsi que le devenir des HAP dans les sols. Enfin la variabilité spatio-temporelle de ces deux points y est illustrée, amenant aux objectifs de la thèse. Le deuxième chapitre présente les matériels et méthodes utilisés allant des analyses de sols aux outils de biologie moléculaire et présentant les analyses statistiques et géostatistiques utilisées pour comprendre les processus. Les résultats sont présentés en quatre chapitres, rédigés en anglais et présentés sous forme d'articles. Les chapitres 3 et 6 font l'objet d'articles sous-presses acceptés, respectivement dans les revues PlosOne et Microbial Ecology tandis que les chapitres 4 et 5 doivent être soumis. Enfin le septième chapitre correspond à une discussion générale des différents résultats obtenus et présente quelques perspectives de travail.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1. Synthèse bibliographique

1.1 *Les microorganismes et leur diversité dans les sols*

1.1.1 Les microorganismes dans les sols

Dans les milieux terrestres, les organismes vivants les plus abondants et les plus diversifiés sont les microorganismes, regroupant les bactéries, les champignons, les protozoaires et les archées (Bertrand et al. 2012). Les bactéries et les champignons sont des acteurs essentiels au bon fonctionnement des sols, notamment à travers leur rôle dans les étapes clés des cycles biogéochimiques de l'azote et du carbone, et constituent une communauté microbienne en constante interaction dans leur écosystème. Dans le sol, cette communauté microbienne présente une capacité à s'adapter aux variations de son environnement, qu'elles soient d'ordre pédoclimatiques, biologiques (végétation) ou anthropiques. Le développement des techniques de biologie moléculaire a considérablement favorisé la caractérisation de ces communautés, puisque 99% des bactéries environnementales ne sont pas cultivables. Ainsi la mise en œuvre de techniques plus ou moins exhaustives, allant des techniques d'empreintes moléculaires générant des profils de diversité des communautés dominantes aux techniques de séquençage haut débit, permettant d'identifier la quasi-totalité de la communauté microbienne, a permis d'identifier et de comprendre davantage les interactions entre les microorganismes et leur environnement.

Les microorganismes sont présents à différentes densités et répartis de manière hétérogène dans les sols. Par exemple, la structure du sol (taille des agrégats) définit des microenvironnements plus ou moins riches en carbone organique (Ranjard et al. 2000) et la profondeur (différents horizons de sols) induit des gradients de disponibilité en nutriments (Fierer et al. 2003), modifiant la densité, la diversité et l'activité microbienne. Les caractéristiques du sol influencent la croissance microbienne et définissent la proportion des différents taxons les uns par rapport aux autres. En effet, dans une étude comparant l'abondance bactérienne et fongique dans 3 types de sol, Fierer et al. (2005), ont indiqué que le ratio entre champignons et bactéries était inférieur à 1 dans les sols sous-prairie et désertiques, contrairement aux sols forestiers où la communauté fongique était dominante. Bien qu'il soit difficile d'établir des généralités sur la biomasse de ces deux communautés microbiennes dans les sols, à titre d'exemple Rousk et al. (2010) ont estimé par PCR quantitative l'abondance bactérienne et fongique, en ciblant respectivement les gènes codant l'ARNr 16S et 18S à 10^8 et 10^3 copies de gènes par gramme de sol. Par ailleurs, dans un sol sous prairie la biomasse fongique pourrait atteindre jusqu'à $250 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de matière sèche dans

la couche superficielle du sol, tandis que pour les bactéries une densité de 4.10^5 à $3,8. 10^7$ UFC par gramme de sol sec a été estimée à partir de l'analyse de 40 sols arables (Bertrand et al. 2012; Buscot and Varma 2005). Dans les sols, les communautés microbiennes sont principalement constituées des phyla bactériens *Proteobacteria*, *Acidobacteria* et *Actinobacteria* (Janssen 2006; Fierer et al. 2007a) et des phyla fongiques *Ascomycota* et *Basidiomycota* (Klaubauf et al. 2010; Buée et al. 2009b). Comme ont pu l'indiquer différentes études, la structure, l'abondance et l'activité de ces communautés varient en fonction d'un grand nombre de paramètres (**Figure 1.1**).

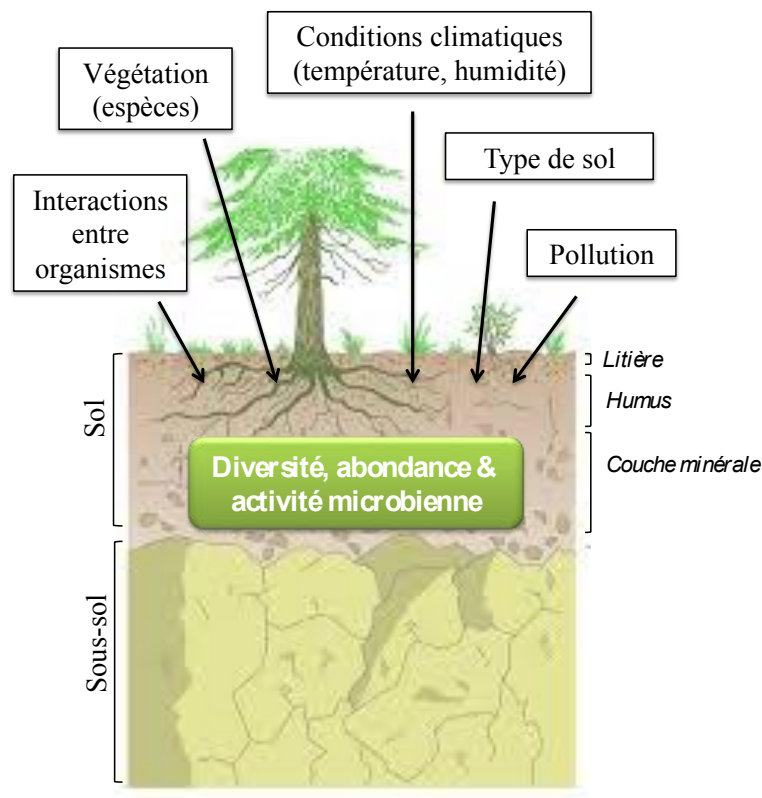


Figure 1.1. Différents paramètres impactant la diversité, l'abondance et l'activité des communautés microbiennes du sol.

Il a été largement décrit dans la littérature que la biomasse microbienne et l'abondance relative des différents phyla composant les communautés microbiennes pouvaient varier selon différents facteurs, tels que les paramètres édaphiques (Fierer and Jackson 2006; Lauber et al. 2009), l'usage du sol, la présence de végétation (Berg and Smalla 2009) et les conditions environnementales (Lauber et al. 2013; Davey et al. 2012). Des modifications climatiques, hydriques ou l'apparition d'une pollution peuvent induire un stress pour les microorganismes et modifier l'activité, la densité et la structure des communautés (Yang et al. 2014a; Gołębiewski et al. 2014a). Certains de ces paramètres sont difficilement dissociables car ils

sont dépendants les uns des autres, et ont souvent pour finalité un impact sur la disponibilité en ressources du sol. L'étude de la biogéographie de certains sites, permettant de mettre en relation la répartition spatiale à l'échelle d'un territoire des caractéristiques physico-chimiques d'un sol et de sa biodiversité, a contribué à mettre en évidence l'impact des paramètres édaphiques et de l'usage du sol sur la biomasse et la structuration des communautés microbiennes (Fierer and Jackson 2006; Dequiedt et al. 2009; Dequiedt et al. 2011) (**Figure 1.2**). Toutefois, l'évaluation de l'impact de ces différents facteurs sur la diversité microbienne dépendrait de l'échelle d'échantillonnage (Fierer and Jackson 2006). Parmi les différents facteurs impactant la diversité microbienne dans les sols, les paramètres édaphiques (pH et la teneur en matière organique), climatiques, la présence et le type de végétation ainsi que la présence de pollutions industrielles, seront développés dans la suite de ce chapitre.

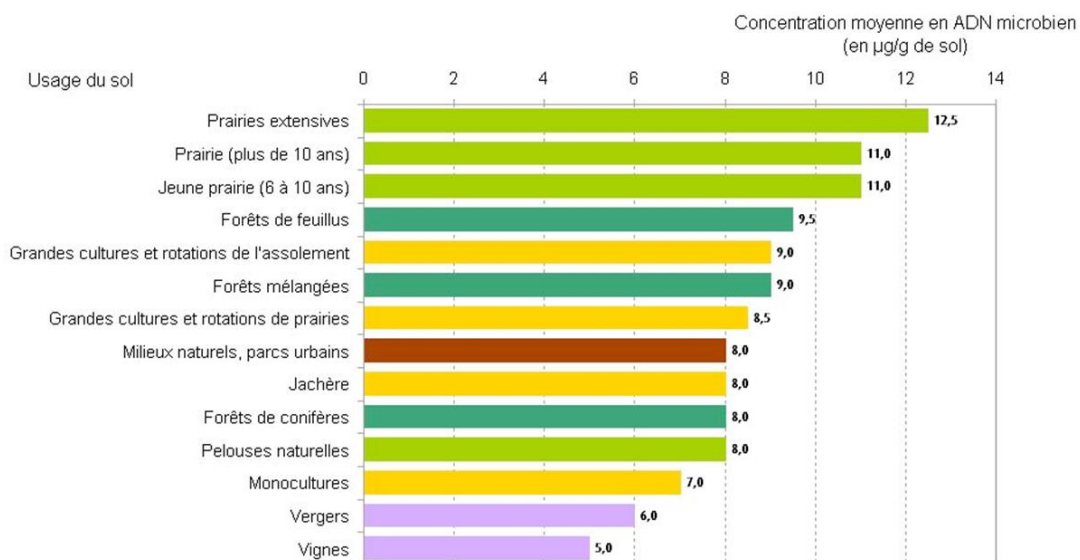


Figure 1.2. Evolution de la biomasse microbienne en fonction de l'usage des sols, suite à une étude biogéographique menée à l'échelle de la France, dans le cadre du programme RMQS (Réseau de Mesure de la Qualité des Sols) (extrait de Plateforme Genosol INRA Dijon, GIS Sol -2012).

1.1.2 Facteurs influençant la diversité microbienne dans les sols

1.1.2.1 Les paramètres édaphiques et climatiques

Selon le type de sol (nature de la roche mère sur lequel il s'est développé) et l'usage qu'il en est fait, les caractéristiques physico-chimiques d'un sol peuvent être différentes. De plus elles peuvent varier au cours des saisons et en fonction du climat (température, hydrométrie). De nombreuses études se sont intéressées à la caractérisation des communautés microbiennes

dans différents types de sols (Janssen 2006; Roesch et al. 2007; Fierer et al. 2007b). Une analyse comparative de la diversité bactérienne dans des sols forestiers, présentant des pH plus faibles et des ratios C/N plus élevés que des sols sous prairie, a par exemple montré des différences en termes de composition des communautés, avec davantage d'*Actinobacteria* sous prairie où la teneur en azote total était plus élevée. D'après cette étude les principaux facteurs expliquant la structure des communautés bactériennes seraient les espèces arboricoles et le pH du sol (Nacke et al. 2011). En effet, la diversité est dépendante des caractéristiques endogènes du sol, telles que sa texture, son pH, ou sa teneur en matière organique (Ranjard et al. 2000; Fierer and Jackson 2006; Nacke et al. 2011).

Les communautés microbiennes sont plus ou moins sensibles aux variations de l'environnement et leur structure peut être modifiée en réponse à la variation de paramètres exogènes tels que l'humidité et la température. Par exemple, un suivi sur 2 ans de la diversité bactérienne dans un sol forestier en condition tempérée a montré que les variations de température et d'humidité faisaient varier les ressources en azote et en carbone, entraînant ainsi une adaptation des *Acidobacteria*, dont l'abondance variait avec les variations nutritives (Rasche et al. 2011). Selon Zhang et al. (2013a), l'humidité du sol est un paramètre majeur impactant la diversité bactérienne, et principalement les *Proteobacteria*. Toutefois, l'impact de ces deux facteurs climatiques sur la structuration des communautés bactériennes semble varier en fonction des études et également selon l'usage du sol. Par exemple, Lauber et al. (2013) ont montré que la diversité bactérienne était corrélée positivement à l'humidité et négativement à la température dans des sols agricoles, tandis que seule l'humidité influençait la diversité dans des sols sous prairie. De plus, la variabilité temporelle de l'humidité et de la température était davantage observée dans les sols agricoles où les interactions entre les espèces végétales, souvent peu variées, seraient moindres que dans le sol sous prairie (Lauber et al. 2013). La structure des communautés fongiques, notamment celles associées à la phyllosphère de tiges de bryophytes dans un sol forestier, est également influencée par les conditions climatiques, qui évoluent au cours des saisons (Davey et al. 2012).

La disponibilité en nutriments, elle-même dépendante du type de sol est aussi un paramètre essentiel, puisqu'elle impacte l'abondance des différents groupes taxonomiques dans les sols (Fierer et al. 2007a). Ainsi des groupes écologiques ont pu être définis au sein des communautés microbiennes. Les bactéries oligotrophes (par exemple le taxon *Acidobacteria*) présentent une croissance lente permettant de s'adapter aux milieux pauvres en nutriments

tandis que les bactéries copiotrophes (*Betaproteobacteria* et *Bacteroidetes*) qui ont des besoins nutritifs importants, dégradent préférentiellement des sources de carbone simples et présentent un taux de croissance élevé lorsque le milieu est riche (Fierer et al. 2007a). Ces variations de ressources en nutriments apparaissent également dans un sol en fonction de la profondeur. La profondeur induirait une spatialisation des communautés microbiennes dans le sol. En effet l'abondance, la composition et la diversité des communautés bactériennes et fongiques varieraient selon les horizons du sol, l'horizon organique de surface favorisant les phyla impliqués dans la dégradation de la matière organique, et l'horizon minéral plus en profondeur, favorisant les espèces oligotrophes. Par exemple, Will et al. (2010) ont indiqué que la diversité bactérienne serait corrélée positivement à la quantité de carbone organique, à l'azote total et au ratio C/N qui diminue avec la profondeur dans un sol sous prairie. Des résultats similaires ont été observés dans des sols forestiers. Une étude comparative des communautés actives et totales, dans des sols plantés de conifères très acides (pH 3,7-3,8), a permis de mettre en évidence une organisation stratifiée selon les horizons du sol, des bactéries et des champignons au cours de la décomposition de la matière organique (Baldrian et al. 2012), avec une abondance plus importante des champignons dans la litière et une augmentation de la densité bactérienne avec la profondeur du sol, où les teneurs en carbone et en azote sont plus faibles.

Parmi les différents paramètres impactant la diversité et la densité microbienne d'un sol, le pH est l'un des plus importants car il est relié plus ou moins directement à certaines fonctions et caractéristiques du sol, telles que la biodisponibilité des nutriments, la solubilité des métaux et le type de végétation présente (Brady and Weil 2010). De plus les variations de pH peuvent imposer certaines contraintes physiologiques aux microorganismes, et notamment provoquer un état de stress dans le cas de pH extrêmes, qui favorisent certains taxons capables de s'adapter aux dépens d'autres dont la croissance est inhibée. Bien que certaines bactéries aient la capacité de se développer à des pH extrêmes, la plupart croît à des pH autour de la neutralité, dans une gamme allant de 5 à 8 unités pH (Bertrand et al. 2012). Globalement les bactéries seraient davantage sensibles aux variations de pH que les champignons (Lauber et al. 2009; Rousk et al. 2010; Fierer et al. 2009). Par exemple, une étude menée en parallèle sur les populations bactériennes et fongiques d'un sol arable, a montré que la diversité et l'abondance bactérienne étaient corrélées positivement au pH, dans une gamme allant de pH 4 à 8, tandis que ce paramètre n'affectait pas l'abondance et peu la diversité fongique (Rousk et al. 2010). En effet les champignons seraient capables de se développer à des gammes de pH

(de 5-9) plus larges que les bactéries sans phénomène d'inhibition de croissance (Bertrand et al. 2012). Certains taxons fongiques sont plus ou moins sensibles à l'acidité du milieu. Ainsi l'abondance des *Hypocreales* serait corrélée positivement au pH (dans une gamme de 4 à 8 unités pH) contrairement aux *Helotiales* (Rousk et al. 2010). Au sein des communautés bactériennes, les groupes taxonomiques répondent également de façon différente aux variations de pH. Rousk et al. (2010) ont montré une augmentation de l'abondance des *Gamma-proteobacteria* avec le pH dans des sols agricoles et des réponses différentes ont pu être observées entre les sous-groupes d'*Acidobacteria* (Nacke et al. 2011). Ainsi les membres du sg1 des *Acidobacteria* dominaient la communauté bactérienne à pH bas (pH 4) tandis qu'à un pH plus élevé (pH 8) les *Alpha-proteobacteria* étaient plus abondantes. Des résultats similaires ont été obtenus dans un écosystème alcalin, lors de l'analyse de sédiments d'un lac tibétain présentant une gamme de pH allant de 6 à 11, où une sélection des *Alpha-proteobacteria* lors de l'augmentation du pH a été observée (Xiong et al. 2012). Cependant des résultats différents ont été obtenus dans des sols forestiers et agricoles. En effet, Nacke et al. (2011) ont observé qu'une augmentation de pH serait davantage propice au développement des phyla *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Beta-proteobacteria* qu'à celui des *Alpha-proteobacteria*.

La mise en place d'études biogéographiques a permis d'avoir une approche à plus grande échelle pour comprendre l'impact du pH sur les communautés microbiennes du sol. Ainsi, Landesman et al. (2014) ont montré dans un sol forestier que la réponse de la communauté bactérienne, détectée au niveau de la famille, pouvait également dépendre de la localisation géographique de l'échantillon par rapport à un gradient géographique de pH. D'autre part, une étude menée à l'échelle du continent américain a montré que les variations de pH impactaient principalement les *Actinobacteria*, les *Acidobacteria* et les *Bacteroidetes* et qu'un pH neutre favorisait une diversité bactérienne plus importante dans le sol (Lauber et al. 2009). Dans les sols, isolés à partir d'environnements extrêmes, la réponse des communautés microbiennes aux variations de pH est différente de celle observée dans des écosystèmes plus classiques. L'étude de la diversité bactérienne d'un sol provenant d'un désert antarctique a montré que la diversité et la richesse bactérienne étaient plus faibles à un pH élevé, suggérant l'adaptation et la sélection de certaines populations en conditions plus drastiques (Geyer et al. 2014).

1.1.2.2 L'usage des sols

La structure et la diversité des communautés microbiennes sont variables selon l'usage du sol.

Bien que la principale différence existant entre une forêt et une prairie se situe au niveau du type de végétaux rencontrés, l'usage et les pratiques auxquelles sont exposés ces sols sont également sources de modifications de la biodiversité. L'apport de matière organique *via* la mise en place d'un couvert végétal, dans un environnement pauvre en ressource nutritive, constitue un apport conséquent de nutriments, qui peut favoriser et sélectionner les microorganismes (Berg and Smalla 2009; Will et al. 2010). De même, l'apport d'engrais ou de compost sur une parcelle agricole (Saison et al. 2006), ou la présence d'animaux sur une prairie (Yang et al. 2013), peuvent avoir un impact. Enfin, l'urbanisation et l'anthropisation des sols conditionnent également leur biosphère (Yang et al. 2006).

Dans la littérature, plusieurs études ont montré l'importance de l'usage du sol en comparant la diversité microbienne de sols présentant un type d'occupation différent (**Figure 1.3**). Par exemple, en étudiant la diversité en sols de prairies et forestiers, Nacke et al. (2011) ont mis en évidence une diversité plus riche, au niveau du phylum, dans les pâturages. Ces auteurs ont également montré que les taxons majoritairement représentés dans ces deux écosystèmes étaient les *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* et les *Firmicutes* avec une abondance relative de chacun des phyla qui variait selon l'usage du sol.

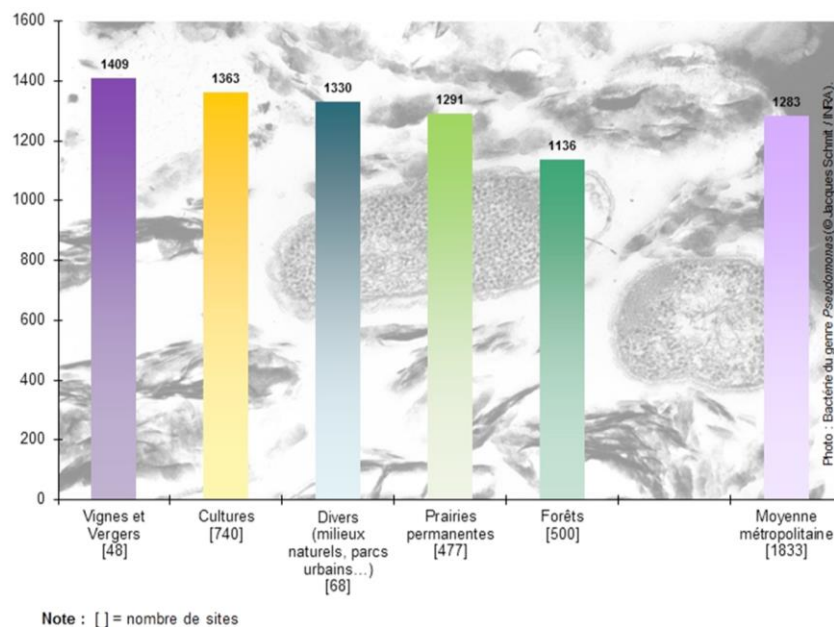


Figure 1.3. Evolution de la richesse microbienne (nombre de taxons microbiens) en fonction de l'usage des sols, en France (Extrait de Plateforme GenoSol – INRA UMR Agroécologie – GIS Sol 2015).

D'autre part, l'impact de la culture des végétaux sur les communautés bactériennes a également été mis en évidence lors d'essais de conversion de sols désertiques en sols

agricoles, où une plus grande diversité et une plus grande représentativité des *Firmicutes* au sein des communautés bactériennes ont pu être observées (Köberl et al. 2011). De plus, ces auteurs ont observé que la culture de ces sols extrêmes entraînait des modifications au sein des communautés, avec notamment l'extinction de bactéries extrémophiles et le développement d'espèces bactériennes antagonistes de champignons phyto-pathogènes, ce qui tend à préserver la santé des végétaux.

Malgré les modifications de diversité que peuvent entraîner les changements d'usage d'un sol, il est important de souligner que l'histoire, à travers le passé culturel du sol, reste un critère majoritaire influençant spécifiquement la composition de sa communauté microbienne (Jangid et al. 2011). Par exemple, Suleiman et al. (2013) ont observé en comparant un sol forestier et un sol sous prairie, obtenus 8 ans plus tôt par conversion du sol forestier, une diversité bactérienne proche.

1.1.2.3 La pollution des sols

Les communautés microbiennes du sol sont en constant remaniement, en réponse aux différentes modifications de leur environnement. Suivant les microorganismes, qui peuvent être impliqués dans des fonctions biologiques variées, les mécanismes de résistance et d'adaptation à un stress sont différents ce qui explique les modifications observées au sein des communautés microbiennes. La notion de résilience, qui correspond à la capacité d'un écosystème à se développer en modifiant son fonctionnement pour répondre à un stress puis à retrouver au cours du temps un fonctionnement proche de celui précédant le stress, a été particulièrement utilisé pour caractériser la réponse des communautés microbiennes aux stress environnementaux (Bordenave et al. 2007; Bertrand et al. 2012). Parmi les différents stress que peuvent subir les communautés microbiennes d'un sol (hydrique, thermique), l'impact des contaminations chimiques sur la diversité a été également décrit dans la littérature. Différentes études se sont particulièrement intéressées aux pollutions industrielles dans les écosystèmes terrestres, qui concernent de nombreux sites urbanisés. Afin de comprendre l'impact de ces stress chimiques sur les communautés microbiennes du sol, il est important de considérer deux phénomènes : l'effet d'une contamination chronique à long terme, jusqu'ici assez peu documenté, et l'impact d'une contamination ponctuelle à court terme, ne mettant pas en œuvre les mêmes réponses adaptatives chez les microorganismes du sol.

Globalement, à court terme la pollution d'un sol, qu'elle soit métallique (Gans et al. 2005) ou organique (Yang et al. 2014b; Bell et al. 2014a), diminue la diversité et la richesse microbienne avec un impact de la concentration en polluant sur la structure des communautés microbiennes. En effet, la toxicité des métaux sur les populations microbiennes entraîne une modification de la proportion des populations sensibles et résistantes à cette pollution (Giller et al. 2009). En testant l'impact de différentes concentrations en métaux lourds sur l'activité des communautés microbiennes de différents types de sol, Kandeler et al. (1996) ont également indiqué que la biomasse microbienne et les activités enzymatiques, impliquées dans le fonctionnement des cycles biogéochimiques, diminuaient lorsque la concentration en métaux augmentait. Ces phénomènes de toxicité n'ont pas été décrits seulement dans des sols industriels mais aussi dans des sols agricoles, présentant une contamination métallique (Giller et al. 1998). Ces auteurs soulignaient par ailleurs l'impact des propriétés du sol (pH, Eh, teneur en matière organique) sur la biodisponibilité des métaux et donc leur toxicité. En plus de la concentration, la composition de la pollution métallique est un paramètre important qui peut structurer les communautés bactériennes du sol. En effet, en testant en microcosmes l'impact d'une contamination en Cu, Hg et Cd, individuellement ou en mélange, Ranjard et al. (2006) ont montré que l'association des métaux peut avoir des répercussions plus importantes sur les communautés. Alors qu'une résilience a été observée après 60 jours, suite à une pollution au Cu (50 et 150 mg.kg⁻¹), une pollution plus importante ou plus complexe semble davantage impacter la communauté bactérienne.

A plus long terme, la toxicité de l'environnement induit au sein des communautés la sélection de populations capables de survivre (tolérance), potentiellement capables de dégrader les pollutions organiques (Yang et al. 2014c), ou capables de résister et transformer les polluants métalliques (Gołębiewski et al. 2014b; Poirel et al. 2013) indépendamment du site géographique. Dans des sols présentant une contamination chronique aux métaux lourds, tels que les sols miniers, une adaptation des communautés microbiennes liée à la concentration en métaux a pu être observée, avec notamment un enrichissement dans des zones fortement polluées en taxon spécifique (*Choroflexi*) et une augmentation de la transcription de gènes impliqués dans la résistance aux métaux (Epelde et al. 2015). D'autre part, l'étude de la contamination métallique datant de 1970, de différents sols forestiers en Pologne a également permis de mettre en évidence une adaptation des communautés à la pollution, à travers des modifications de l'abondance de certains taxa et l'augmentation de gènes de résistance aux métaux avec la pollution. Cependant l'absence d'impact de la concentration en métaux sur la

diversité fonctionnelle, étudiée par GeoChip®, suggère à long terme une résilience des communautés microbiennes (Azarbad et al. 2015). Dans les sols pollués, la biodisponibilité des métaux conditionnerait la structure des communautés bactériennes, sans en changer la richesse, et favoriserait un enrichissement en bactéries extrêmophiles, avec notamment la sélection de certaines espèces acidophiles et tolérantes aux métaux (Linton et al. 2007). De plus dans des sols contaminés aux hydrocarbures, plusieurs auteurs ont observé un enrichissement en *Archées* et ont détecté des OTUs (Operational Taxonomic Units) strictement anaérobies, telles qu'*Anaerolineae*, *Clostridia* et *Thermotogae*, dont l'abondance augmentait avec la pollution, suggérant également la sélection de populations capables de croître en conditions relativement drastiques par ce type de pollution (Sutton et al. 2013; Abed et al. 2015). Par ailleurs, une étude menée sur un sol agricole chinois a indiqué que la contamination en métaux lourds induisait à long terme une toxicité pour les communautés microbiennes ce qui diminuait leur activité, mais aussi leur abondance et impactait la structure et la diversité des communautés bactériennes et fongiques (Deng et al. 2015). En effet, la contamination métallique inhiberait les capacités métaboliques, estimées par des tests Biolog® et colorimétriques, des microorganismes du sol à dégrader des composés simples tels que les acides aminés et les amides ou à oxyder l'ammonium (Gremion et al. 2004). Concernant les pollutions organiques, la réponse des communautés microbiennes en terme de diversité, suite à une pollution de type hydrocarbure, sera développée dans la suite de ce chapitre (§ 1.3.3.2.1).

1.2 Les microorganismes dans la rhizosphère

1.2.1 La rhizosphère : généralités

La rhizosphère est définie comme le volume de sol impacté par l'activité racinaire (Hiltner 1904; Darrah 1993). Ce compartiment comprend le sol à la surface des racines (rhizoplan) et une zone inférieure à quelques millimètres autour des racines où diffusent les exsudats (rhizosphère). Dans le sol, la rhizosphère correspond à une zone de « hotspot » de nutriments et d'activité biologique (Kumar et al. 2006; Vančura and Hovadík 1965; Chaudhry et al. 2005; Kuzyakov and Blagodatskaya 2015) (**Figure 1.4**). En effet, le relargage de carbone au niveau des racines, *via* les exsudats, en fait une zone complexe, alliant compétition nutritive et interactions microbiennes, avec des gradients en fonction de la distance aux racines. Dans cette zone les microorganismes et les végétaux peuvent mettre en place des associations positives, c'est le cas des symbioses avec des bactéries (nodules avec *Rhizobia* fixateur d'azote) ou des champignons (mycorhizes), ou négatives dans le cas des interactions

pathogènes. Il est établi que suivant les plantes jusqu'à 20 % du carbone fixé par photosynthèse est exsudé au niveau de la rhizosphère (Marschner 1995; Nguyen 2003).

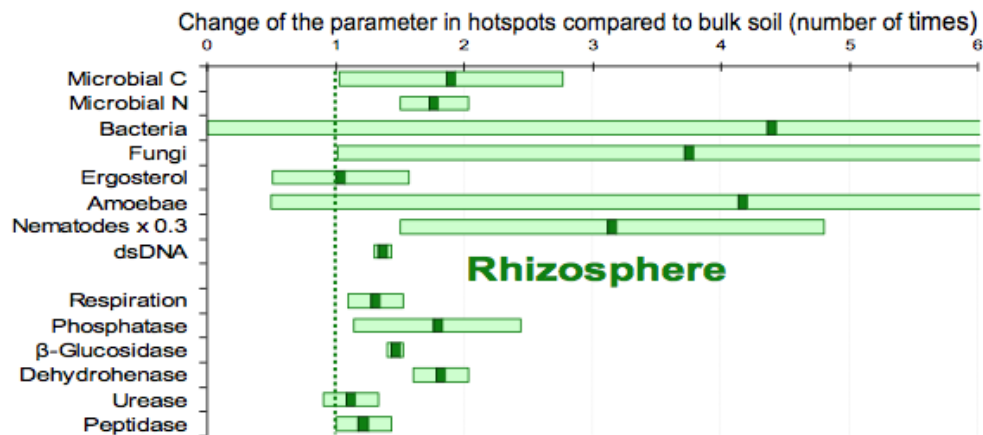


Figure 1.4. Changements des paramètres microbiens dans la rhizosphère (moyenne \pm sd), (d'après Kuzyakov et al. 2015).

1.2.2 L'effet rhizosphère

L'effet rhizosphère correspond à l'augmentation de la biomasse et de l'activité microbienne, due à la minéralisation par les microorganismes de la matière organique secrétée *via* les exsudats racinaires et le mucilage (couche gélatineuse à la surface des racines composée de polysaccharides), par les racines (rhizo-déposition) ou à la décomposition des débris végétaux (**Figure 1.5**). Les données concernant la mesure de l'impact de la rhizosphère sur les microorganismes sont variables selon les études, car dépendantes de différents paramètres, tels que l'espèce végétale, son stade de croissance etc. Ainsi Bodelier et al. (1997) ont estimé que dans la rhizosphère les microorganismes seraient 19 à 32 fois plus abondants que dans le sol non rhizosphérique, tandis que Kuzyakov and Blagodatskaya (2015) estiment cette augmentation à un facteur 4 en moyenne pour les bactéries et les champignons. Pour caractériser la stimulation microbienne dans la rhizosphère, des rapports de la densité microbienne de la rhizosphère et du sol total (R/S) peuvent être calculés. Ce rapport, pouvant varier entre les différents microorganismes, est par exemple plus faible pour les protozoaires et les champignons que pour les bactéries, pour lesquelles des valeurs comprises entre 10 et 20 sont couramment obtenues, avec parfois des valeurs de 1000 (Stengel and Gelin 1998).

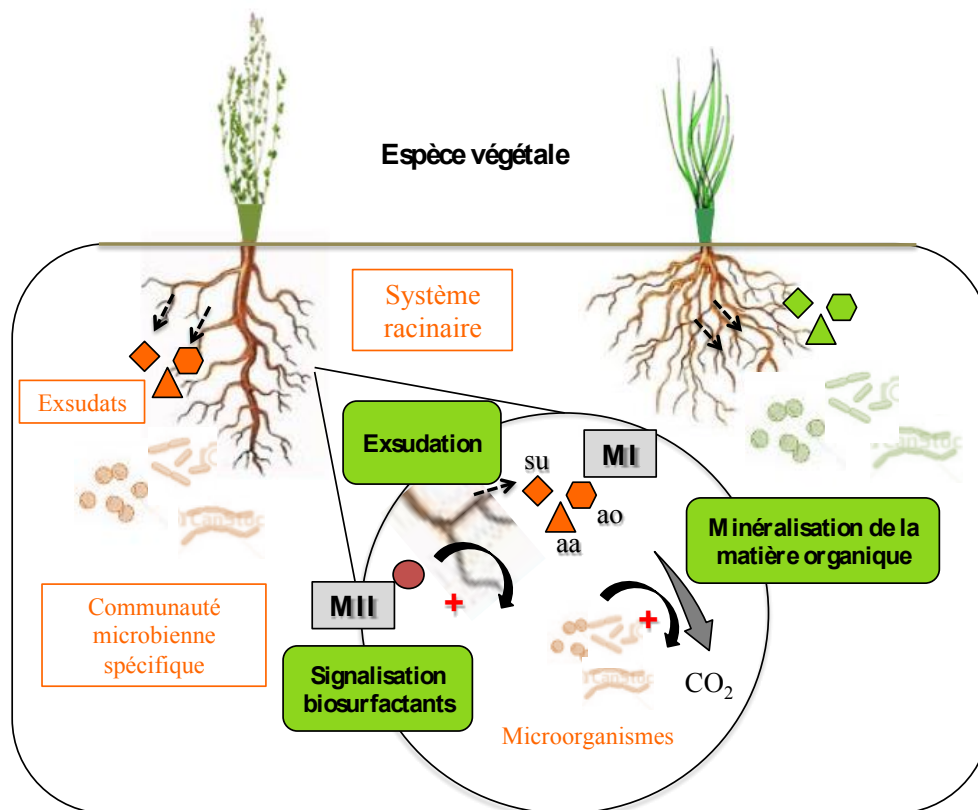


Figure 1.5. Mécanismes impliqués dans l'effet rhizosphère. L'exsudation libère des métabolites primaires (MI) : sucres (su), des acides aminés (aa), des acides organiques (ao), qui sont minéralisés par les communautés microbiennes associées à la rhizosphère et des métabolites secondaires (MII), qui sont des molécules de signalisation pour l'établissement de symbiose (entre les microorganismes et les végétaux) et biosurfactantes.

1.2.2.1 Impact sur l'abondance microbienne

De nombreuses études ont montré que le sol rhizosphérique, caractérisé par une plus forte concentration en carbone et un ratio C/N plus élevé que le sol non planté, présentait une plus grande densité fongique, estimée par la mesure de la concentration en ergostérol qui est multipliée par 50 dans cette zone (Hannula et al. 2010; Chemidlin Prévost-Bouré et al. 2011) et bactérienne (Berg and Smalla 2009). Ainsi dans le sol rhizosphérique le nombre de bactéries pourrait atteindre 10^8 à 10^9 par gramme de sol et la surface racinaire serait colonisée par 100 à 150 cm de filaments fongiques par cm^2 (Bertrand et al. 2012). De plus, le développement des racines crée dans le sol des micro-niches, favorables au développement des microorganismes (Vos et al. 2013). La composition des exsudats, variant selon l'espèce végétale, l'âge de la plante et les conditions du milieu, impacte également l'abondance des populations microbiennes dans le sol (Berg and Smalla 2009; Buée et al. 2009a). Représentant une source de carbone facilement et rapidement dégradé par les

microorganismes, les exsudats sont difficilement étudiés dans le sol, c'est pourquoi ces composés ont principalement été caractérisés lors de cultures stériles en hydroponie (Nguyen 2003). Les exsudats sont des composés aux structures chimiques variées (monomères, polymères, molécules linéaires et aromatiques) (**Tableau 1.1**) qui peuvent être classées en métabolites primaires et secondaires (Nguyen 2003; Badri and Vivanco 2009). Les métabolites primaires, qui représentent des molécules essentielles au développement et au fonctionnement de la plante, regroupent des sucres, des acides organiques et des acides aminés. Les métabolites secondaires quant à eux correspondent à des composés de signalisation, parfois volatiles, impliqués dans les interactions entre les plantes et les microorganismes, c'est le cas par exemple des flavines (Haichar et al. 2014). L'effet des végétaux sur les communautés microbiennes du sol a été principalement mis en évidence au niveau de la zone spécifique du sol rhizosphérique (Kowalchuk et al. 2002). Les végétaux peuvent également modifier les caractéristiques nutritives du sol de façon indirecte, notamment par le dépôt de débris végétaux qui impactent la diversité microbienne plus tardivement au cours du développement de la plante (Berendse 1990).

Tableau 1.1. Exemples de composés constituant les exsudats racinaires, chez *Arabidopsis* (d'après Badri & Vivanco 2009).

Class of compounds	Single components*
Carbohydrates	Arabinose, glucose, galactose, fructose, sucrose, pentose, rhamnose, raffinose, ribose, xylose and mannitol
Amino acids	All 20 proteinogenic amino acids, L-hydroxyproline, homoserine, mugineic acid, aminobutyric acid
Organic acids	Acetic acid, succinic acid, L-aspartic acid, malic acid, L-glutamic acid, salicylic acid, shikimic acid, isocitric acid, chorismic acid, sinapic acid, caffeic acid, p-hydroxybenzoic acid, gallic acid, tartaric acid, ferulic acid, protocatechuic acid, p-coumaric acid, mugineic acid, oxalic acid, citric acid, p-coumaric acid
Flavonols	Naringenin, kaempferol, quercetin, myricetin, naringin, rutin, genistein, strigolactone and their substitutes with sugars
Lignins	Catechol, benzoic acid, nicotinic acid, phloroglucinol, cinnamic acid, gallic acid, ferulic acid, syringic acid, sinapoyl aldehyde, chlorogenic acid, coumaric acid, vanillin, sinapyl alcohol, quinic acid, pyroglutamic acid
Coumarins	Umbelliferone
Aurones	Benzyl aurones synapates, sinapoyl choline
Glucosinolates	Cyclobrassinone, desulphoglucosinapin, desulphoprogoitrin, desulphonapoleiferin, desulphoglucosinapin
Anthocyanins	Cyanidin, delphinidin, pelargonidin and their substitutes with sugar molecules
Indole compounds	Indole-3-acetic acid, brassitin, sinalexin, brassilexin, methyl indole carboxylate, camalexin glucoside
Fatty acids	Linoleic acid, oleic acid, palmitic acid, stearic acid
Sterols	Campesterol, sitosterol, stigmasterol
Allomones	Jugulone, sorgoleone, 5,7,4'-trihydroxy-3', 5'-dimethoxyflavone, DIMBOA, DIBOA
Proteins and enzymes	PR proteins, lectins, proteases, acid phosphatases, peroxidases, hydrolases, lipase

1.2.2.2 Impact sur la diversité microbienne

La libération de ces différentes sources de carbone induit une compétition nutritive entre les microorganismes et une sélection au sein des communautés microbiennes, suivant leur

capacité à dégrader les substrats exsudés. Il en résulte une diminution de la diversité au sein de la rhizosphère (Kowalchuk et al. 2002; Marilley and Aragno 1999; Li et al. 2014b).

Différentes études se sont intéressées à l'impact des végétaux sur la diversité microbienne (§ 1.1.2.2), dans le cadre par exemple de conversion de l'usage des sols, et certaines d'entre elles ont cherché à caractériser plus précisément la structure des communautés microbiennes au sein de la rhizosphère (Baudoin et al. 2002; Broeckling et al. 2008; Haichar et al. 2008). Cette zone serait particulièrement enrichie en bactéries à Gram-négatif (Anderson et al. 1993) et en microorganismes capables de croître rapidement dans des environnements riches en nutriments (copiotrophes). Cependant une autre étude a indiqué dans la rhizosphère un enrichissement spécifique en bactéries à Gram-positif et à forte teneur en GC, telles que des bactéries appartenant aux genres *Nocardia*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* et aux *Actinomycetes* (Smalla et al. 2001). En réalité des microorganismes mobiles et présentant une vitesse de croissance rapide peuvent y être favorisés, de par leur capacité à répondre rapidement à la libération des exsudats (Stengel and Gelin 1998). Au niveau phylum, une augmentation de l'abondance des *Actinobacteria* a déjà été observée dans la rhizosphère de plusieurs espèces végétales (Li et al. 2014a; Smalla et al. 2001; Kawasaki et al. 2012). D'autre part, des bactéries appartenant aux *Rhizobium*, *Azotobacter* et *Pseudomonas*, et des champignons mycorhiziens y ont également été identifiés (Stengel and Gelin 1998). Différentes études ont observé l'effet rhizosphère au niveau des communautés bactériennes totales (Oliveira et al. 2014; Kawasaki et al. 2012; Marschner et al. 2001; Berg and Smalla 2009), mais aussi au niveau fonctionnel, en caractérisant par exemple la capacité des communautés rhizosphériques, selon qu'elles viennent du rhizoplan ou de la rhizosphère et de racines plus ou moins jeunes, à cataboliser différentes sources de carbones exsudées (Baudoin et al. 2001). De la même manière, les exsudats régulent également la composition des communautés fongiques et leur diversité (Broeckling et al. 2008; Berg and Smalla 2009).

De nombreuses études ont montré l'impact de la diversité des espèces végétales sur la structure des communautés microbiennes (Shann and Boyle 1994; Costa et al. 2006; Kowalchuk et al. 2002; Marschner et al. 2001; Puglisi et al. 2013). La sélection des communautés microbiennes se fait principalement à travers les exsudats racinaires, spécifiques de l'espèce végétale, qui induisent chez les microorganismes une compétition pour les ressources nutritives (Haichar et al. 2008); Broeckling et al. 2008). De plus, la morphologie des racines peut également varier entre les plantes, ce qui induit une rétention de

l'humidité différente (Hinsinger et al. 2005; Hertenberger et al. 2002; McNear Jr 2013) (**Figure 1.6**). D'autre part l'activité des racines provoque une diminution de pH dans la rhizosphère, qui peut être due à la libération des exsudats et à la respiration, *via* l'accumulation de CO₂ puis sa transformation en acide carbonique (Hinsinger et al. 2003). Ainsi cette variation de pH au sein de la rhizosphère, liée aux exsudats, pourrait contribuer aux différences de structures de la communauté microbienne, observée entre différentes espèces végétales. En effet ce paramètre a été décrit comme impactant de façon importante la diversité microbienne dans les sols (§ 1.1.2.1).

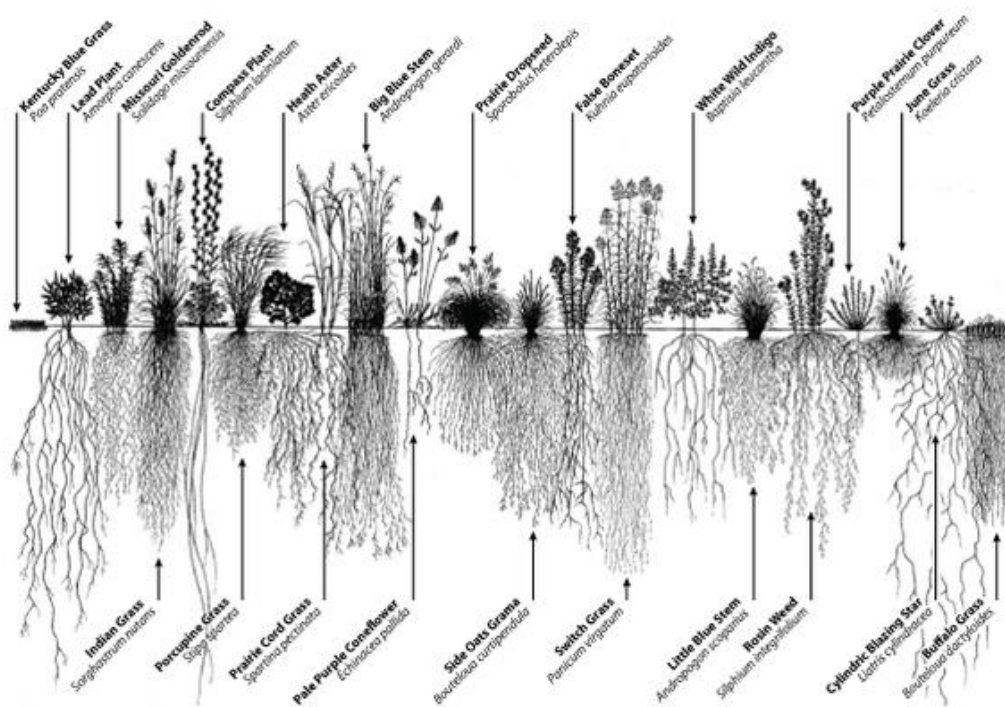


Figure 1.6. Diversité de la morphologie racinaire de différentes espèces végétales retrouvées en sol sous-prairies (d'après McNear 2013).

L'impact de l'espèce végétale sur la diversité des microorganismes du sol a tout d'abord été mis en évidence sur les communautés bactériennes. La composition des communautés bactériennes, colonisant les racines et le sol rhizosphérique, est principalement liée à la structure racinaire, la concentration et la composition des exsudats racinaires qui dépendent de l'espèce végétale (Marschner et al. 2001; Berg and Smalla 2009). Par exemple une étude, réalisée sur des sols forestiers échantillonnés à travers l'Est des Etats-Unis, a mis en évidence une variabilité de la structure des communautés bactériennes, indirectement liée à la variabilité des espèces arboricoles présentes, qui induisent des pH différents dans le sol (Landesman et al. 2014). Des résultats similaires ont été observés par Nacke et al. (2011) lors

de l'étude comparative de neuf sols forestiers, présentant des espèces arboricoles variées, en Allemagne. De plus l'espèce végétale serait davantage structurante pour la communauté bactérienne que le site de culture ou que les conditions environnementales.

En effet des espèces végétales différentes, cultivées sur un site identique, ont présenté une communauté bactérienne associée aux racines qui leur est spécifique (Alekklett et al. 2015) (Figure 1.7). De la même manière, Costa et al. (2006) ont montré, à travers des analyses d'empreintes moléculaires, que la rhizosphère d'un fraisier pouvait sélectionner une communauté bactérienne (riche en *Actinobacteria*) identique lors d'une culture sur trois sols provenant de sites géographiques différents, avec des sols présentant des propriétés physico-chimiques différentes. De plus ce phénomène de sélection par l'espèce végétale serait amplifié par une culture répétée de la même espèce, comme ont pu l'observer Smalla et al. (2001) en étudiant la communauté bactérienne dominante au sein de la rhizosphère de différentes plantes. Toutefois, une variabilité des communautés bactériennes associées aux racines a également pu être observée entre individus d'une même espèce végétale. Par exemple, Peiffer et al. (2013) ont montré, lors de l'étude de plants de maïs présentant des génotypes variés, qu'en plus de l'impact du lieu de prélèvement au sein de la rhizosphère, il existait une variabilité de la communauté bactérienne intra-espèce végétale.

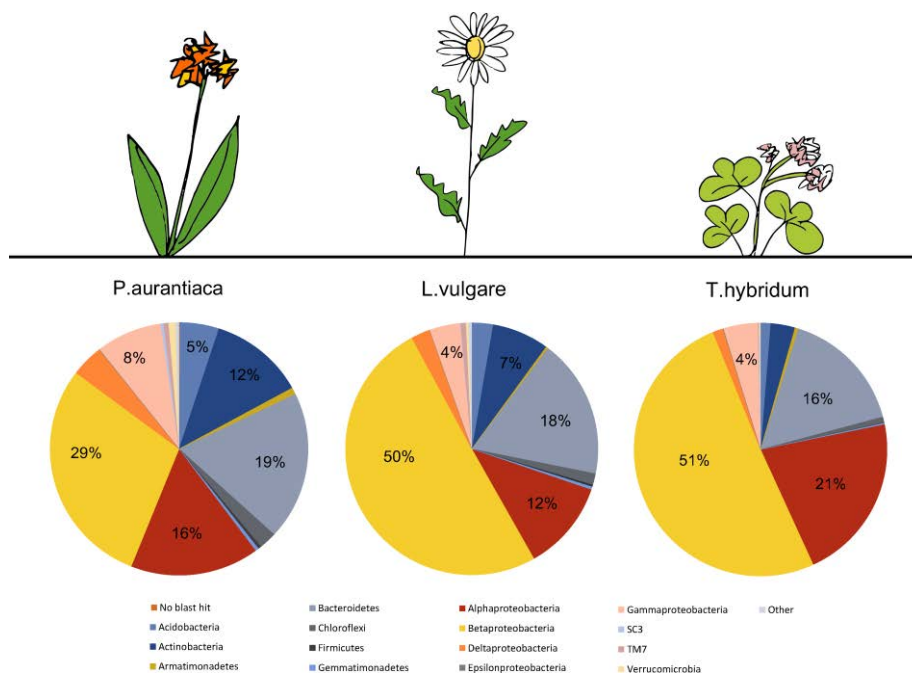


Figure 1.7. Impact de l'espèce végétale sur la diversité bactérienne au niveau phylum (d'après Alekklett et al. 2015).

L'impact de l'espèce végétale sur la structuration des communautés fongiques a également été décrit dans la littérature. En effet, ces acteurs majeurs de la décomposition de la matière organique, dominants au niveau de la litière du sol (Baldrian et al. 2012), présentent une diversité pouvant être également impactée par l'espèce végétale. Les champignons sont des organismes qui présentent beaucoup d'interactions positives (symbiose) ou négatives (pathogénicité) avec les végétaux, ce qui peut expliquer les liens observés entre la biogéographie des diversités fongiques et végétales (Berg and Smalla 2009). Dans des sols forestiers, Buée et al. (2009b) ont montré que, bien que les *Dikarya* (*Ascomycota* et *Basidiomycota*) étaient les taxons majoritaires, la variabilité spatiale de la diversité et les différences de richesses observées pouvaient être expliquées en partie par la présence de différentes espèces arboricoles, distribuées sur ces sols. Dans le cadre de l'étude de la diversité fongique dans des forêts sous des climats différents, à l'échelle de la Chine, Shi et al. (2014) ont observé l'impact croisé de la température et de la diversité végétale sur la diversité des communautés fongiques. Ces auteurs ont montré une corrélation négative entre la diversité des champignons ectomycorhiziens et la diversité des plantes. L'impact de l'espèce végétale sur les communautés fongiques a également été étudié dans d'autres types de sols, comme lors de la comparaison de la structure des communautés fongiques dans la rhizosphère de trois espèces végétales différentes sur un sol alpin. Les auteurs ont pu observer dans cette étude l'impact de l'espèce végétale sur la composition de la communauté fongique, contrairement à l'habitat (prairie versus forêt de saules) (Becklin et al. 2012). La structuration des communautés fongiques serait principalement liée à la concentration en nitrate et en azote soluble, mais également à la morphologie des racines, qui varie selon la plante (Mouhamadou et al. 2013).

1.2.3 Variabilité spatio-temporelle dans la rhizosphère

L'effet rhizosphère est un phénomène dynamique dans le temps et l'espace car il est lié au développement de la plante et de son système racinaire. Il existe un gradient spatio-temporel de pH et des exsudats dans la rhizosphère (Hinsinger et al. 2003; Walker et al. 2003). En effet, il a été montré que suivant l'âge de la plante, la composition et la concentration des exsudats pouvaient varier (Nguyen 2003; Walker et al. 2003). A titre d'exemple lors des dix premiers jours de croissance, des plants de pois et d'avoine exsudaient davantage de sucre et d'acides aminés qu'en fin de croissance (Rovira 1969). En réalité il existe une hétérogénéité spatiale radiale, en fonction de la distance à la racine, mais également avec la profondeur, suivant les différentes classes de racines (apicale, basale), de la quantité de nutriments dans le

sol (P, N, K) (Hinsinger et al. 2003; Hinsinger et al. 2005; Walker et al. 2003). Récemment, le développement de méthodes de mesure non destructive couplées à de l'imagerie, telles que la zymographie et l'utilisation d'optodes planes a permis d'observer dans la rhizosphère, à partir d'expérimentation en rhizotrons, des gradients enzymatiques (Spohn et al. 2013), de pH et d'oxygène (Blossfeld et al. 2011; Rudolph et al. 2012), avec la profondeur. Par ailleurs, la quantité de sucre et d'acides aminés exsudés serait également plus importante au niveau de l'apex (McDougall and Rovira 1970; McCully and Canny 1985; Nguyen 2003), toutefois un gradient qualitatif d'exsudat le long de la racine n'a à notre connaissance pas encore été clairement décrit. Une revue récente abordant l'hétérogénéité spatiale et temporelle des microorganismes dans le sols a suggéré le concept de hot moments en complément de hotspots pour qualifier la variabilité spatio-temporelle des mécanismes se produisant notamment dans la rhizosphère (Kuzyakov and Blagodatskaya 2015).

Cette variabilité spatio-temporelle dans la rhizosphère impact les communautés microbiennes du sol. Par exemple, Hannula et al. (2010) ont observé que la composition de la communauté fongique dans le sol rhizosphérique variait en fonction du taux de rhizo-déposition, en lien avec l'âge de la plante. Ainsi au début de la croissance de la plante, la communauté fongique était dominée par les *Basidiomycota* dans le sol témoin non planté et rhizosphérique, puis un enrichissement en *Ascomycota* a été observé dans ce dernier compartiment en fin de croissance, cependant les exsudats induisant ces modifications n'ont pu être identifiés. De plus, l'âge des racines peut également impacter les communautés microbiennes en fonction des sources de carbones mises à disposition. Ainsi les zones racinaires âgées constituent des zones où des ressources en carbones peu accessibles sont obtenues par décomposition des racines (cellulose et hémicellulose lignifiée), favorisant les champignons saprophytes en comparaison avec les zones racinaires plus jeunes (Moore and William Hunt 1988). Ces zones assez pauvres en nutriments pourraient favoriser des communautés microbiennes oligotrophes tandis que les racines apicales, et ramifiées, *via* une importante exsudation, sélectionneraient des communautés copiotrophes (Walker et al. 2003).

Le statut nutritif de la plante, lié à son âge, pourrait également modifier la composition des exsudats racinaires, et donc potentiellement impacter la structure des communautés microbiennes (Yang and Crowley 2000). En effet, le développement racinaire dans un sol induit également une variabilité spatiale de l'activité biologique et des nutriments, selon que les racines sont plus ou moins jeunes et actives. Ainsi la libération non homogène selon l'axe

racinaire d'exsudat, induit aussi un gradient de pH dans l'espace (Hinsinger et al. 2003). En effet le système racinaire est constitué de différents types de racines qui présentent une activité d'exsudation et de respiration différente : les racines apicales en croissance étant davantage actives que les racines plus âgées (Hinsinger et al. 2005; Marschner et al. 1987) (Figure 1.8).

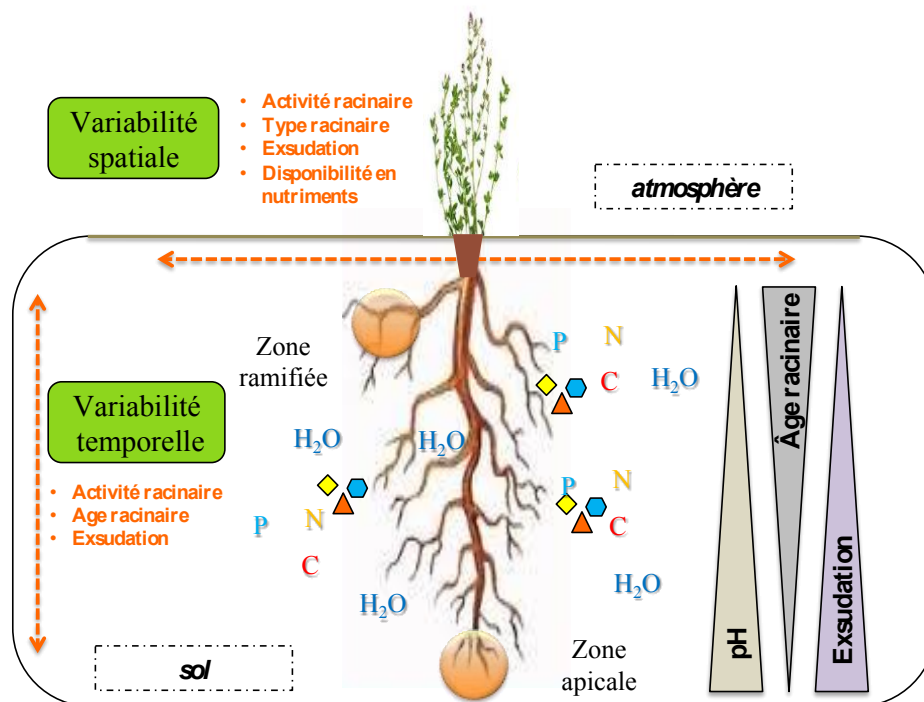


Figure 1.8. Variabilité spatio-temporelle des processus rhizosphériques qui entraînent des gradients de pH et d'exsudation avec la profondeur en fonction de l'âge racinaire (P: phosphore, N: azote, C: carbone).

Cette dynamique spatio-temporelle au sein du système racinaire, dépendante de l'espèce végétale et de la structure des racines, a pour conséquence une variabilité spatiale des communautés microbiennes dans la rhizosphère (Baudoin et al. 2001; Baudoin et al. 2002). Ce phénomène a été étudié en fonction de la distance à la racine (Jin et al. 2009; Marilley and Aragno 1999; Corgié et al. 2006) et en fonction de la localisation de la racine dans l'intégralité de son système racinaire (Yang and Crowley 2000). L'existence d'un gradient radial de diffusion de 20 mm autour de la racine, pour les exsudats et les composés volatiles, suggère l'existence d'une variabilité spatiale des communautés microbiennes à petite échelle (Hafner et al. 2014). Il est important de noter que la complexité du sol est accentuée par l'accumulation de différentes racines, pouvant appartenir à des espèces végétales variées, qui présentent des gradients spatio-temporels différents qui se superposent.

Enfin, l'hétérogénéité propre du sol, liée à sa structure, sa disponibilité en nutriments et en eau, peut également avoir des répercussions sur la variabilité spatiale du système racinaire, qui explore son environnement (Hinsinger et al. 2005). Cela peut soulever la question de l'impact de la présence de polluant sur la variabilité spatiale du système racinaire.

1.3 Les HAP dans les sols

1.3.1 Définition et origines

Les HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques) sont des composés organiques, présentant au moins deux cycles benzéniques fusionnés (Li and Chen 2002) que l'on peut retrouver abondamment dans l'environnement (atmosphère, eau, sol) et qui sont toxiques, mutagènes et carcinogènes selon les molécules.

Ces composés résultant principalement de la combustion incomplète de la matière organique (Wilcke 2000) peuvent être d'origine naturelle (feu de forêt, éruption volcanique) ou anthropogénique. En parallèle de la production liée à l'activité humaine quotidienne (transport, chauffage domestique), le développement au 20^{ème} siècle de secteurs industriels tels que la sidérurgie et associés à l'exploitation du charbon et du pétrole (Hill and Ghoshal 2002) a contribué à une part importante de la contamination en HAP de l'environnement. En effet, ces activités industrielles produisent des HAP, notamment lors de la pyrolyse de combustibles fossiles à haute température et en faible concentration en oxygène. Par exemple, dans le domaine de la métallurgie ces sites industriels étaient souvent associés à une cokerie, permettant la production de combustible pour alimenter les hauts fourneaux (par pyrolyse de la houille), mais générant également une pollution en HAP (Hill and Ghoshal 2002). D'autre part l'utilisation dans le passé de créosote, une huile extraite de goudron de houille, afin de protéger le bois utilisé notamment sur les voies ferrées, constitue une autre source de contamination en HAP des sols (Allard et al. 2000). Le démantèlement d'activités industrielles liées à l'exploitation du charbon a conduit à l'existence de nombreuses friches industrielles, qui présentent ainsi parfois des concentrations élevées en HAP.




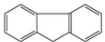


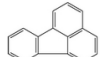

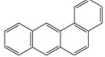
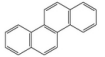
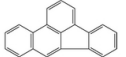
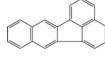
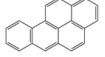
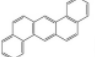
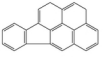

1.3.2 Caractéristiques physico-chimiques

La réactivité et l'évolution des HAP dans les sols sont directement liées aux caractéristiques physico-chimiques de ces composés. Ainsi suivant la masse moléculaire, le nombre de cycles, la solubilité et l'hydrophobicité des HAP, les comportements observés peuvent varier. Bien qu'il existe une multitude de molécules, combinant un nombre différent de cycles

aromatiques, la plupart des études s'intéressent particulièrement au devenir de 16 HAP (**Tableau 1.2**), définis par l'Agence Américaine pour la Protection Environnementale (US-EPA) comme prioritaires, de par leur toxicité et leur persistance dans l'environnement (Keith and Telliard 1979). Parmi ces 16 HAP, les molécules ont été groupées selon leur nombre de cycles (2-3, 4 et 5-6 cycles) afin d'étudier le comportement des composés selon leur structure, considérant les HAP possédant respectivement moins et plus de 4 cycles comme appartenant aux HAP de faible et de haut poids moléculaire.

Globalement les HAP sont des molécules toxiques peu solubles en solution aqueuse et hydrophobes, ce qui favorise leur rétention dans l'environnement et au sein des organismes. La solubilité dans l'eau (Haeseler et al. 1993) et la volatilité des HAP, mesurée par la pression de vapeur saturante, sont inversement proportionnelles au nombre de cycles et au poids moléculaire de la molécule (Mackay et al. 1992) (**Tableau 1.2**). Ainsi la classe 2-3 cycles regroupe les molécules de HAP les plus volatiles et les plus solubles. L'hydrophobicité des HAP, mesurée par le coefficient de partage octanol/eau (LogKow), quant à elle augmente avec la complexité de la molécule. Ce paramètre est important car il permet d'expliquer la rétention de certains HAP dans le sol, qui présente également des régions plus ou moins hydrophobes (Marschner 1999).

Tableau 1.2. Caractéristiques physico-chimiques des 16 HAP prioritaires (liste de l'US-EPA) (d'après Mackay et al. 1992).

Composé	Groupe	Formule semi-développée	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Solubilité (mg.l ⁻¹)	Volatilité (log K _{ow})	Hydrophobicité (Pa)
Naphtalène (Nap)	2-3 cycles		128,2	31	3,4	36,8
Acénaphtylène (AcPy)			152,2	16,1	4,0	4,14
Acénaphthène (AcP)			154,2	3,8	3,9	1,52
Fluorène (Flu)			166,2	1,9	4,2	0,715
Phenanthrène (Phe)			178,2	1,1	4,6	0,113
Anthracène (Ant)			178,2	0,05	4,5	0,0778
Fluoranthène (FL)	4 cycles		202,3	0,26	5,2	8,72.10 ⁻³
Pyrène (Pyr)			202,3	0,13	5,2	0,0119
Benzo(a) anthracène (BaA)			228,3	0,01	5,9	6,06.10 ⁻⁴
Chrysène (Chr)			228,3	0,002	5,6	8,4.10 ⁻⁷
Benzo(b)fluoranthène (BbFL)	5-6 cycles		252,3	0,002	5,8	6,7.10 ⁻⁵
Benzo(k)fluoranthène (BkFL)			252,3	0,001	6,0	4,12.10 ⁻⁶
Benzo(a)pyrène (BaP)			252,3	0,004	6,0	2,13.10 ⁻⁵
Dibenzo(a,h)anthracène (DBA)			278,4	0,0006	6,8	9,16.10 ⁻⁸
Indéno(1,2,3c-d)pyrène (InP)			276,3	0,062	6,6	1,3.10 ⁻⁸
Dibenzo(g,h,i)pérylène (BghiP)			268,4	0,0003	6,5	2,25.10 ⁻⁵

1.3.3 Devenir des HAP dans les sols

Dans les sols industriels la pollution est complexe. Elle comprend par exemple du coke, du goudron de houille et des asphaltes (mélange de bitume et de granulats) routiers, qui regroupent une variété de composés organiques aux propriétés différentes, tels que des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques (HAP) (Ahn et al. 2005; Biache et al. 2008; Biache et al. 2011). Des composés aromatiques polycycliques polaires (pPAC), qui présentent un atome d'azote, d'oxygène ou de soufre leur conférant une solubilité plus importante que les HAP, sont également retrouvés sur les friches industrielles principalement dans les réservoirs d'eau (Lundstedt et al. 2006). De par leurs caractéristiques (faible solubilité et forte hydrophobicité), les HAP ont tendance à s'accumuler dans l'environnement et dans les sols en particulier, où ils sont soumis à un ensemble de processus abiotiques et biotiques gouvernant leur devenir (**Figure 1.9**). De plus ils interagissent au cours du temps avec les constituants du sol, les communautés microbiennes et les végétaux pouvant se développer dans les sols contaminés, modifiant alors leur statut.

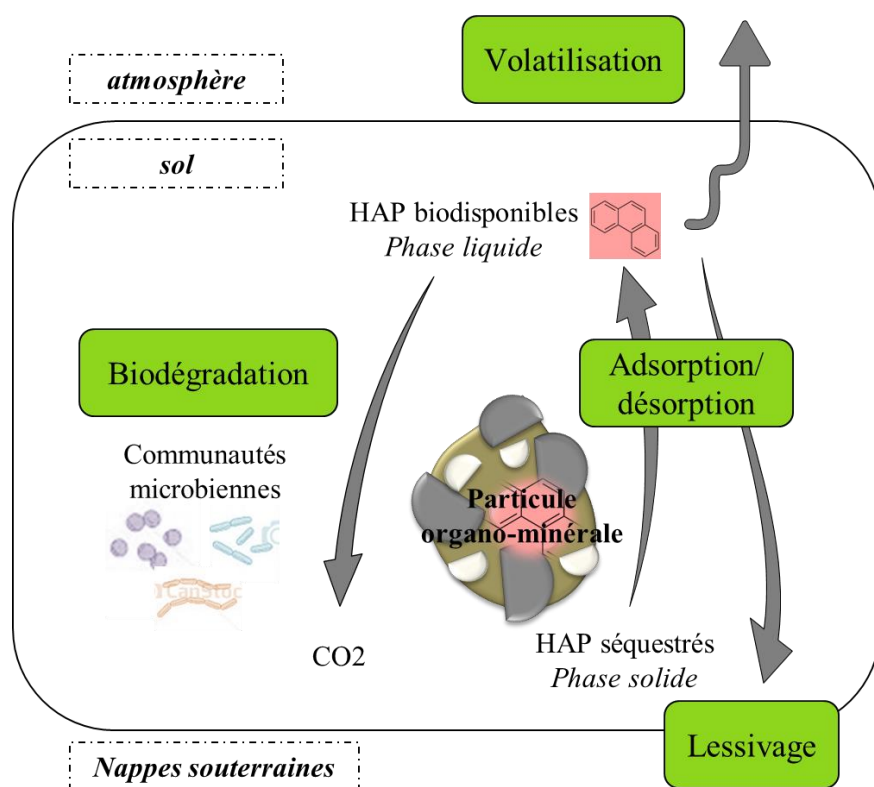


Figure 1.9. Principaux mécanismes impliqués dans le devenir des HAP dans les sols.

Les différentes études qui ont cherché à caractériser la contamination ou le devenir des HAP dans les sols, ont révélé une hétérogénéité de la pollution dans l'environnement, avec la présence de « hotspots » de polluant. En effet dans les sols de friches industrielles, et notamment de cokerie, les molécules de HAP sont principalement piégées à des pépites de goudron, associant particules de charbon, de coke et des minéraux, ce qui accroît l'hétérogénéité de la pollution en HAP (Ahn et al. 2005). L'étude de la variabilité spatiale de la teneur en HAP a été principalement réalisée à l'échelle kilométrique (Li et al. 2010; Villanneau et al. 2013) et métrique (Carlou et al. 2001; Bengtsson and Törneman 2009; Bengtsson et al. 2010; Bengtsson et al. 2013; De Fouquet et al. 2011) grâce notamment à l'utilisation d'outils de géostatistique (**Figure 1.10**). D'autres études, moins nombreuses ont été menées à une échelle plus fine, de l'ordre du centimètre (Hybholt et al. 2011; Johnsen et al. 2014; Törneman et al. 2008; Mukherjee et al. 2014). Cette approche a permis de mettre en relation la co-variation spatiale de différents paramètres du sol, en traçant des cartes d'estimation statistique à partir d'un nombre limité de point d'échantillonnage.

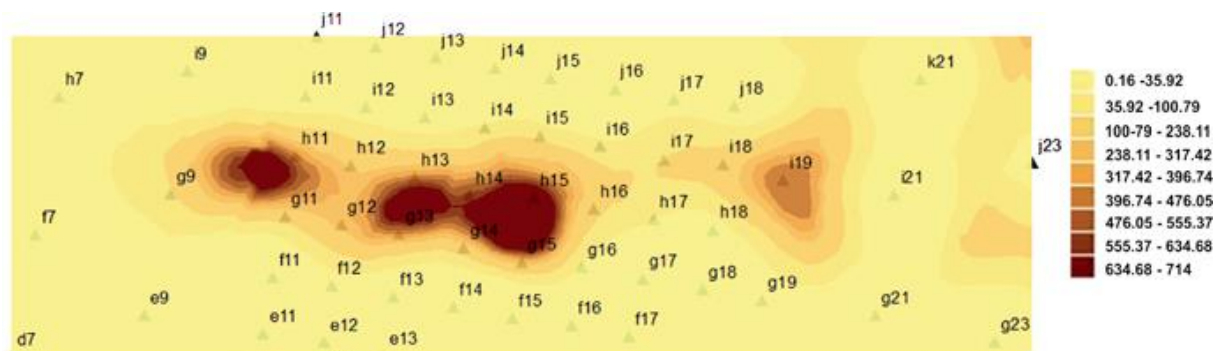


Figure 1.10. Carte d'estimation par krigeage de la concentration en HAP sur un site finlandais (grille d'échantillonnage de 20 m x 80 m), contaminé au créosote, (concentration en ppm) (d'après Mukherjee et al. 2014).

1.3.3.1 *Processus abiotiques*

Parmi les différents processus abiotiques qui peuvent affecter le devenir des HAP dans l'environnement, regroupant la volatilisation, la photo-oxydation et le lessivage, l'adsorption des molécules à la matrice organo-minérale du sol est un phénomène majeur conduisant à la persistance de la pollution en diminuant sa capacité à interagir avec des organismes vivants : la biodisponibilité du polluant. Cette fraction biodisponible peut être évaluée (i) en estimant le taux de transfert du polluant du sol aux cellules vivantes (ii) ou le taux de dégradation du polluant. Le comportement des polluants organiques hydrophobes dans les sols a été

largement décrit dans la littérature, présentant une modification des différentes fractions du polluant au cours du temps, avec notamment une diminution des fractions disponibles et biodégradables et une augmentation des fractions non extractibles et récalcitrantes à la dégradation (Semple et al. 2003; Naidu et al. 2008) (**Figure 1.11**). Certains auteurs ont également précisé la notion de bioaccessibilité qui est plus large et qui caractérise des composés biodisponibles et qui pourraient le devenir au cours du temps ou suite à des réarrangements spatiaux (Naidu et al. 2008). Cependant ces deux termes sont soumis à de nombreuses définitions qui peuvent varier selon les auteurs. Par ailleurs, différentes méthodes peuvent être utilisées pour quantifier cette fraction biodisponible, utilisant des tests écotoxicologiques, des extractions aqueuses ou des résines (Reid et al. 2000; Barnier 2009; Naidu et al. 2008). La biodisponibilité des HAP est un paramètre essentiel, impactant la séquestration du polluant dans l'environnement, qui est liée aux caractéristiques physico-chimiques des HAP et du sol mais aussi à la complexité de la contamination.

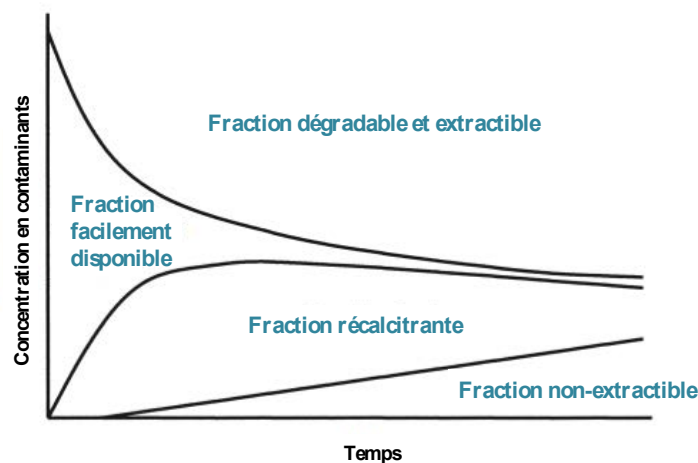


Figure 1.11. Impact du temps sur l'extractibilité et la biodisponibilité des polluants organiques hydrophobes dans les sols, (d'après Semple et al. 2003).

La texture et les constituants du sol (matière organique et minéraux, notamment l'argile) sont des paramètres majeurs influençant ces phénomènes d'adsorption/désorption des HAP. Par exemple en s'intéressant à la distribution d'un mélange de huit HAP au niveau de quatre fractions d'agrégats de taille différente, Amellal et al. (2001a) ont montré l'impact de la texture du sol en retrouvant ces molécules plus concentrées au niveau des fractions fines du sol, favorisant ainsi leur persistance. Des résultats similaires ont également été observés lors de l'étude de la répartition de la contamination historique au sein d'un sol industriel (Amellal et al. 2001b), avec une accumulation des HAP au niveau des limons fins où le ratio C/N était plus élevé.

Par ailleurs des phénomènes différents d'adsorption des HAP ont pu être observés selon les constituants du sol. Appert-Collin et al. (1999) ont par exemple observé, en étudiant les propriétés de sorption de deux molécules de HAP sur différentes matrices de sable et de sol, une adsorption forte en présence de matière organique contrairement aux matières minérales. Les mécanismes d'adsorption à la matière organique sont dépendants de sa composition, puisque des taux d'adsorption rapide (substances humiques) et lente (substances kérogènes) peuvent être observés (Huang et al. 2003). Les substances humiques, sont des composés importants dans la séquestration réversible des HAP dans les sols en raison de leurs propriétés hydrophobes. Ainsi en étudiant l'impact des acides humiques sur le transfert du pyrène des minéraux argileux à l'eau, Fanget et al. (2002) ont montré que ces molécules pouvaient augmenter l'adsorption du polluant en s'associant à ces minéraux argileux, ce qui diminuait son transfert vers les phases liquides.

En plus du temps de contact, la teneur (Bogan and Sullivan 2003; Cornelissen et al. 2005; Liu et al. 2008) en matière organique et la composition minérale du sol sont des facteurs essentiels qui régissent la séquestration des HAP (Müller et al. 2007; Angove et al. 2002; Choudhary and Mantri 2000). Dans le cadre de l'étude *in situ* de la pollution d'un sol, une autocorrélation spatiale positive a été observée entre la concentration en HAP et la teneur en matière organique du sol (Bengtsson and Törneman 2009; Bengtsson et al. 2013). Dans ces phénomènes de séquestration, après adsorption des HAP à la surface des molécules, les composés sont piégés dans les micropores du sol, les rendant inaccessibles aux microorganismes et à leurs enzymes (Bogan and Sullivan 2003; Alexander 2000). Ce phénomène est accentué au cours du vieillissement de la pollution appelé « aging » limitant ainsi sa dégradation avec le temps (Allard et al. 2000; Semple et al. 2003; Ma et al. 2012b) (**Figure 1.12**). Cependant, la séquestration des HAP dans le sol serait partiellement réversible, conduisant à un relargage dans le temps des polluants dans l'environnement qui diminue au cours du temps (aging) (Ma et al. 2012b). Les phénomènes de désorption décrits seraient liés à la structure de la matière organique mais aussi à celle des HAP, qui sont tous deux impliqués dans ces phénomènes d'adsorption (Wang et al. 2012), mais également à la distribution des micropores du sol (Luo et al. 2012).

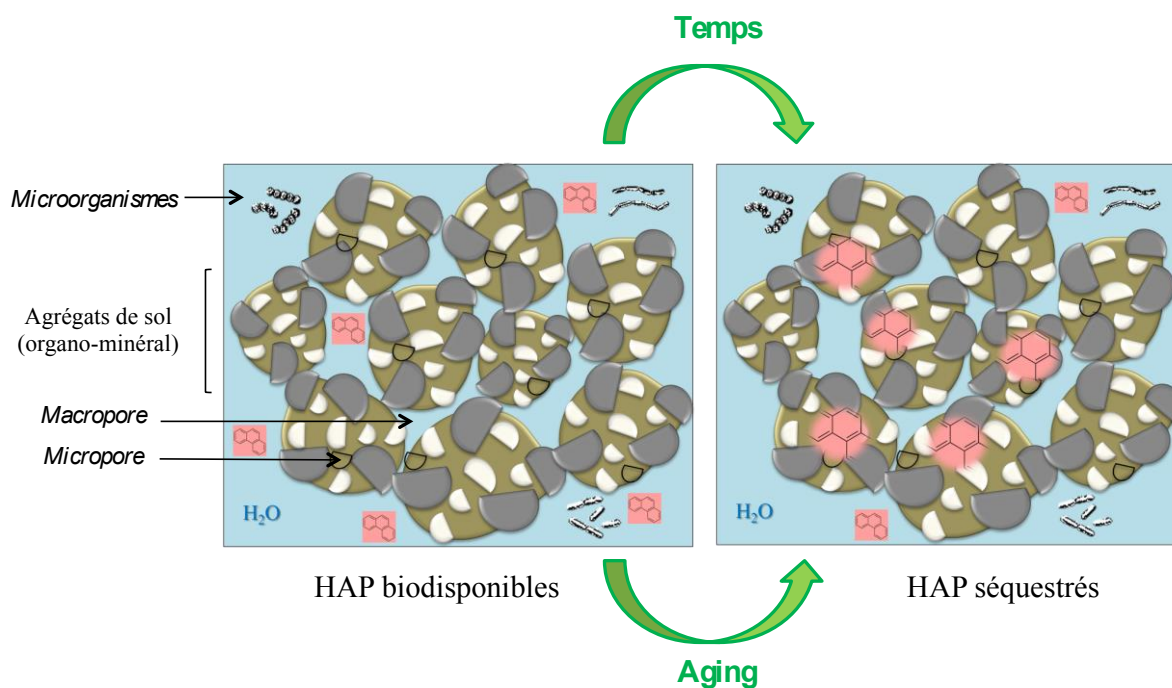


Figure 1.12. Phénomène d'aging conduisant à une augmentation de la séquestration des HAP aux agrégats de sol au cours du temps.

La rétention des HAP dans les sols peut également être impactée par leurs propriétés physico-chimiques. Ainsi des HAP de haut poids moléculaire, ayant un $\text{Log } K_{ow}$, et une hydrophobicité élevés, et une faible volatilité et solubilité dans l'eau, seraient davantage adsorbés à la matière organique et peu mobiles dans le sol (Styrishave et al. 2012). En réalisant des quantifications de HAP sur différentes quantités de sol, lors de sous-échantillonnage, ces auteurs ont montré qu'en impactant les mécanismes de rétention dans les sols, les propriétés physico-physiques des HAP induisaient une hétérogénéité spatiale de la pollution à petite échelle. Dans une étude visant à modéliser l'adsorption des HAP à la goethite, Tunega et al. (2009) ont mis en évidence l'impact de la structure moléculaire de ces composés sur leur fixation à la surface des minéraux. Ainsi l'anthracène, grâce à une structure linéaire, présenterait la plus forte affinité au minéral étudié. La combinaison de ces différents paramètres contribuerait à augmenter l'hétérogénéité des HAP dans les sols, et limiterait leur disponibilité et donc leur biodégradation (Juhasz et al. 2014).

1.3.3.2 *Processus biotiques*

Les microorganismes du sol, bactéries et champignons, ont la capacité à dégrader ou transformer les HAP et peuvent ainsi contribuer à leur élimination dans l'environnement. La biodégradation peut toutefois être limitée *in situ* par la biodisponibilité des HAP.

Par ailleurs, la présence des HAP dans les sols induit des mécanismes de toxicité, qui conduisent à la sélection et l'adaptation des microorganismes, avec des modifications des communautés microbiennes et notamment la sélection de populations capables de les dégrader. Enfin le processus de transformation ou dégradation partielle peut conduire à la formation de métabolites, qui peuvent eux aussi présenter une certaine toxicité, parfois plus élevée que celles des molécules mères (Phillips et al. 2000).

1.3.3.2.1 Impact des HAP sur la diversité microbienne

Dans le but de comprendre l'impact de la pollution sur les microorganismes, de nombreuses études se sont intéressées aux effets directs en conditions simplifiées, ou en ajoutant un ou des HAP à un sol non pollué. Il a été montré qu'une pollution aux hydrocarbures modifiait la composition de la communauté bactérienne, en favorisant les taxons *Gamma-proteobacteria* et *Bacteroidetes* et diminuait la diversité (Yang et al. 2014a; Sawulski et al. 2014). Ce phénomène est probablement dû à la toxicité des molécules qui exercent une pression sur les écosystèmes. Ces derniers auteurs ont également observé une modification des communautés fongiques et archéennes lors de l'ajout de différentes molécules de HAP dans le sol, avec une variabilité des phyla dominants suivant le composé ajouté (Sawulski et al. 2014).

Des résultats similaires ont été observés lors de l'étude de l'impact à long terme d'une pollution chronique, mettant en évidence une modification de la structure des communautés, révélatrice de leur adaptation. Une diminution de la richesse, de la diversité bactérienne et une modification de la structure des communautés ont été observées sur un sol bordant une voie de chemin de fer, contaminé aux hydrocarbures (Sutton et al. 2013). La capacité d'adaptation à une contamination varie entre les groupes taxonomiques microbiens, en lien avec leurs capacités physiologiques et leurs implications dans le fonctionnement du sol. Par exemple, Mukherjee et al. (2014) ont observé que dans un sol historiquement contaminé à la créosote, les zones les plus concentrées en HAP contenaient davantage de bactéries appartenant au *Proteobacteria* contrairement aux *Actinobacteria*, *TM7* et *Planctomycètes*. D'autres études se sont intéressées à la réponse à la contamination par des HAP de l'ensemble de la communauté microbienne, en comparant notamment l'effet des HAP sur les bactéries et les champignons du sol. Au cours d'une étude menée sur des sols d'une ancienne usine pétrochimique, présentant différents niveaux de contamination (de l'ordre de 2000 mg.kg⁻¹ de HAP pour les zones les plus contaminées), Bell et al. (2014a) ont montré que la diversité et la structure des communautés fongiques étaient plus fortement impactées par la contamination en HAP que

celle des communautés bactériennes. Les différentes études *in situ* de la contamination ont parfois mis en évidence une corrélation positive entre la diversité bactérienne et la teneur en HAP. En effet dans ces sols assez pauvres en nutriments, les polluants organiques peuvent constituer des sources de carbone pour les bactéries, augmentant ainsi leur abondance et leur diversité dans ces milieux (Juck et al. 2000; Feris et al. 2004). La biodégradation microbienne étant un des mécanismes principaux conditionnant le devenir des HAP dans le sol, plusieurs études se sont intéressées à caractériser l'hétérogénéité spatiale des communautés microbiennes en parallèle de celle du polluant. Ainsi, il a été montré que les zones les plus concentrées en HAP étaient plus riches en bactéries à Gram-négatif contrairement aux populations bactériennes à Gram-positif et fongiques, plus abondantes dans les zones présentant des concentrations en HAP moindres (Törneman et al. 2008; Bengtsson et al. 2010). De plus au sein de ces hotspots de HAP, les mêmes auteurs ont pu observer davantage de diversité, de richesse microbienne et une population fonctionnelle, de bactéries capables de dégrader les HAP, plus abondante (Bengtsson et al. 2013).

Dans l'environnement, les contaminations sont souvent complexes, associant une variété de polluants organiques et/ou métalliques, présentant des réactivités propres, et des concentrations différentes dans le sol, ainsi les microorganismes sont soumis à des stress multiples. Différents auteurs ont cherché à caractériser les conséquences d'une multi-contamination sur le fonctionnement biologique de sols (Cébron et al. 2009; Thion et al. 2012a). Par exemple, Thavamani et al. (2012) et Sawulski et al. (2014) ont montré que la contamination en HAP et en ETM (éléments traces métalliques) du sol d'une ancienne usine à gaz entraînait une diminution de la diversité bactérienne, modifiait la structure des communautés microbiennes mais également leurs activités, notamment à travers l'utilisation de mesures d'activités enzymatiques, révélatrices de la respiration et la nitrification. Des outils similaires ont également été utilisés par Cébron et al. (2011a), montrant l'intérêt d'utiliser une approche combinant des mesures de diversité, d'abondance et de capacité fonctionnelle des communautés microbiennes pour caractériser la toxicité de tel environnement sur les organismes. De plus Sawulski et al. (2015) ont indiqué que le taux de dégradation de certains HAP dépendait du mélange complexe dans lequel ils étaient présent dans le sol, la composition du mélange impactant la structure des communautés bactériennes et fongiques.

1.3.3.2.2 Sélection de populations dégradantes

Quelques études ont montré que dans les sols pollués, la structure des populations microbiennes fonctionnelles, estimée en ciblant des gènes spécifiques, était modifiée au profit de populations capables de dégrader les polluants. Par exemple, Zhang et al. (2013b) ont observé, dans un sol contaminé aux HAP suite à l'implantation d'une usine pétrochimique, une augmentation de l'abondance des gènes de dégradation, corrélée positivement à la teneur en HAP. Des résultats similaires ont été obtenus par différents auteurs (Bengtsson et al. 2013; Sawulski et al. 2014; Cébron et al. 2008), qui ont indiqué une augmentation de l'abondance des populations bactériennes potentiellement dégradantes aux endroits où la concentration en HAP était la plus élevée, par la quantification des gènes de dégradation dans des sols historiquement contaminés. Ce phénomène a été également décrit pour d'autres types de pollution organique, telle que les pesticides (Monard et al. 2013). Une autre étude a également montré une corrélation entre l'augmentation de l'abondance de ces gènes appartenant à des bactéries à Gram-positif et le pourcentage de dégradation des HAP (Sawulski et al. 2015). Ce phénomène confirme ainsi au cours du temps la sélection dans l'environnement de populations adaptées à la contamination en hydrocarbures.

1.4 La biodégradation des HAP

La dégradation microbienne est le principal mécanisme conduisant à une diminution de la teneur en HAP dans l'environnement, *via* une transformation en composés intermédiaires (métabolites) ou une minéralisation complète en carbone inorganique (CO₂) (Peng et al. 2008). La biodégradation peut être réalisée via deux mécanismes différents : le métabolisme microbien où les HAP sont utilisés comme source de carbone et d'énergie, et le co-métabolisme où les microorganismes ne tirent aucun bénéfice du polluant pour leur croissance lors de sa dégradation. Les HAP peuvent être dégradés par des organismes procaryotes (bactéries) et eucaryotes (champignons et algues), et la littérature présente de nombreuses espèces dégradantes appartenant notamment aux *Proteobacteria*, *Actinobacteria* et *Firmicutes*, qui ont été isolées et caractérisées à partir d'environnements contaminés (Haritash and Kaushik 2009; Cerniglia 1992; Thion et al. 2012b).

Globalement, la dégradation microbienne nécessite une première étape d'oxydation de la molécule, toutefois une dégradation anaérobie des HAP, moins bien caractérisée, a pu également être mise en évidence. Les voies cataboliques des HAP de faible poids moléculaire ont été largement décrites, pour des organismes modèles (en cultures pures), contrairement

aux HAP de haut poids moléculaire qui sont davantage récalcitrants à la dégradation microbienne de par leurs caractéristiques physico-chimiques.

1.4.1 Dégradation anaérobie

La biodégradation anaérobie des HAP est un processus peu décrit dans la littérature. Ce phénomène implique différents métabolismes anaérobies, tels que la réduction de nitrates ou la sulfato-réduction. (Juhasz and Naidu 2000; Bonin et al. 2004). Bien que la dégradation anaérobie des hydrocarbures puisse être réalisée par une variété d'espèces bactériennes et de consortium microbiens, la dégradation spécifique des HAP a été peu décrite dans la littérature, où la biodégradation de HAP légers tel que le naphthalène y est principalement démontrée (Bonin et al. 2004).

Quelques études ont porté sur l'oxydation anaérobie des HAP, essentiellement à 2-3 cycles. Par exemple, Ambrosoli et al. (2005) a montré lors de l'étude de la dégradation de différentes molécules de HAP en anaérobiose en condition dénitrifiante par un consortium bactérien dans un sol, que le taux de dégradation dépendait des substrats carbonés apportés en parallèle. Ainsi en présence de glucose ou d'acétate, les processus de co-métabolisme seraient favorisés et une meilleure dégradation des HAP était observée. L'utilisation de phénanthrène marqué a permis de montrer que la dégradation de ce composé, par un consortium de bactéries sulfato-réductrices provenant de sédiment contaminé, est due à une carboxylation directe en C2, et implique une espèce de *Desulfococcus* (Davidova et al. 2007). En s'intéressant à l'impact de la succession d'épisodes aérobie et anaérobie sur la biodégradation des HAP, Vitte et al. (2011) a indiqué que les communautés bactériennes endogènes d'une boue contaminée aux hydrocarbures présentaient la capacité à s'adapter à ces deux conditions pour dégrader les polluants. Par ailleurs, l'étude de la dégradation anaérobie du méthyl-naphthalène a permis d'identifier les différents gènes impliqués dans ce mécanisme, et aboutissant à la formation d'acetyl-CoA et de CO₂ (Selesi et al. 2010). En revanche dans les sols, la biodégradation anaérobie des HAP semble moins fréquente que la biodégradation aérobie.

1.4.2 Dégradation aérobie

1.4.2.1 Cas des HAP légers

1.4.2.1.1 Implication des bactéries

L'étude de la dégradation aérobie du naphthalène comme HAP modèle a permis de mettre en évidence la voie catabolique de cette molécule chez une variété de souches bactériennes (Cerniglia 1992), puis de caractériser précisément les voies de dégradation de différents HAP de faible poids moléculaire (naphthalène, phénanthrène, anthracène, fluorène), qui peuvent différer notamment de par la position des carbones attaqués.

La dégradation de ces molécules peut être réalisée par une variété d'espèces bactériennes différentes, appartenant par exemple aux *Actinobacteria* (*Mycobacterium spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Arthrobacter sulphureus* RKJ4), *Alpha-* (*Rhizobium galegae*, *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505, *Beijerinckia mobilis*), *Beta-* (*Ralstonia sp.*, *Comamonas sp.*, *Alcaligenes sp.*), *Gamma-Proteobacteria* (*Pseudomonas aeruginosa*, *Cycloclasticus sp.*, *Haemophilus spp.*), *Firmicutes* (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus sp. PN/Y*) et *Bacteroidetes* (*Flavobacterium spp.*) (Peng et al. 2008; Fernández-Luqueño et al. 2011; Vila et al. 2015; Gupta et al. 2015; Bisht et al. 2015).

Globalement, après l'incorporation de deux atomes d'oxygène dans le cycle aromatique par une dioxygénase, le cis-dihydrodiol produit est transformé en catéchol par une déshydrogénase. Puis suivant la position des groupements hydroxyles de cette molécule, une ortho- ou une méta- fission du composé aromatique par une deuxième dioxygénase, permet la production respectivement d'acide succinique et d'acétyl CoA (en position ortho) ou d'acide pyruvique et d'acétaldéhyde (en position meta), pouvant par la suite rejoindre le métabolisme du carbone via le cycle de Krebs (**Figure 1.13**). Actuellement les voies de dégradation d'autres HAP sont connues et des étapes similaires à celles décrites pour la dégradation du naphthalène ont pu être identifiées (Haritash and Kaushik 2009).

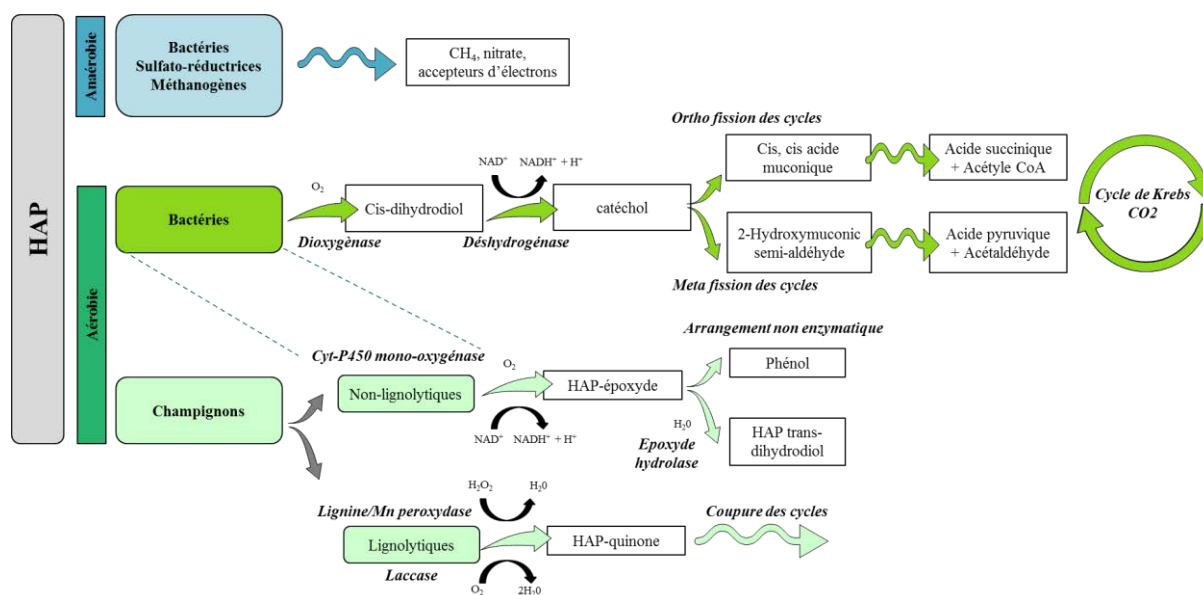


Figure 1.13. Synthèse des principales voies de biodégradation des HAP légers en aérobose et en anaérobose, chez les bactéries et les champignons, (d'après Cerniglia et al. 1992, Peng et al. 2008 et Haritash et al. 2009).

1.4.2.1.1.1 Gènes de dégradation : les HAP dioxygénases

Le genre bactérien *Pseudomonas putida* a été le premier à partir duquel les gènes de dégradation des HAP et notamment la dioxygénase PAH-RHD (Ring Hydroxylating Dioxygenase) ont été identifiés. Depuis ces gènes de dégradation ont été identifiés chez une variété de genres bactériens (Habe and Omori 2003). Les HAP dioxygénases sont impliquées dans la première étape du métabolisme aérobie des HAP. Bien que ces enzymes présentent une variabilité et une spécificité selon les composés, certaines d'entre elles permettent l'oxydation de plusieurs molécules (Cerniglia 1992). Cette enzyme clé est constituée de 3 éléments : une ferredoxine, une ferredoxine-réductase et une protéine fer-soufre, elle-même formée de 2 sous-unités alpha et beta (Habe and Omori 2003).

Il existe une variabilité de la sous-unité alpha de cette enzyme, selon la spécificité de substrat et selon que les dioxygénases sont produites par des bactéries à Gram-positif (*Actinobacteria*) ou à Gram-négatif (*Proteobacteria*). Ainsi, ces enzymes, et les gènes codant leur synthèse, sont des cibles privilégiées pour quantifier les populations impliquées dans la biodégradation des HAP. Afin de pouvoir quantifier par la technique de PCR (polymerase chain reaction) quantitative en temps réel l'abondance de ces populations bactériennes, potentiellement capables de dégrader les HAP dans les sols, deux couples d'amorces dégénérées, ciblant le gène qui code pour la sous-unité alpha de la dioxygénase, ont été développés par Cébron et al.

(2008). Ces amorces ont été construites dans le but de pouvoir détecter les genres les plus couramment impliqués dans la biodégradation des HAP. Ainsi le couple d'amorces PAH-RHD Gram-positif permet d'amplifier les gènes codant les HAP dioxygénases chez les genres *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardioïdes* et *Terrabacter*, appartenant aux *Actinobacteria*, tandis que les amorces PAH-RHD Gram-négatif sont spécifiques des genres *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Commamonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, et *Polaromonas*, appartenant aux *Proteobacteria*. L'utilisation de ces amorces permet de quantifier dans les sols une diversité de populations dégradantes, présentant des capacités cataboliques différentes selon les composés (Cébron et al. 2008). Par exemple, les populations dégradantes à Gram-positif seraient davantage impliquées dans la dégradation des HAP lourds que les populations à Gram-négatif (Kästner et al. 1994).

Bien qu'ils puissent être génomiques, les gènes codant les HAP dioxygénases peuvent aussi être localisés sur des plasmides, qui peuvent être échangés entre les bactéries par des transferts horizontaux (Akhmetov et al. 2008), favorisant ainsi l'adaptation des communautés bactériennes à la pollution.

1.4.2.1.2 Implication des champignons

Les champignons participent à la dégradation des HAP principalement par co-métabolisme. Une variété d'espèces fongiques a pu être identifiée comme capables de dégrader des HAP de différents poids moléculaires. Par exemple des espèces appartenant aux *Ascomycota* (*Aspergillus ochraceus*, *Cladosporium herbarum*, *Trichoderma sp.*), *Glomeromycota* (*Glomus intraradices*) et aux *Basidiomycota* (*Trametes versicolor*, *Phanerochaete chryosporium*, *Irpex lacteus*) ont été identifiées (Gupta et al. 2015). Ces microorganismes transforment les HAP en composés intermédiaires moins complexes. Globalement les espèces fongiques dégradantes peuvent être classées en deux groupes ; les champignons ligninolytiques et non-ligninolytiques, présentant deux mécanismes de dégradation différents.

1.4.2.1.2.1 Les champignons ligninolytiques

Les basidiomycètes de la pourriture blanche possèdent différentes enzymes non spécifiques, qui leur permettent de dégrader la lignine, un polymère du bois possédant des cycles aromatiques. Par homologie structurale, d'autres molécules aromatiques telles que les HAP, peuvent également être oxydées par ces enzymes. Ces enzymes extracellulaires, regroupant la lignine et manganèse peroxydase et la laccase (phénol-oxydase), ont la possibilité d'accéder

et de dégrader plus facilement des HAP adsorbés à la matrice du sol que les enzymes bactériennes qui sont intracellulaires (Gianfreda and Rao 2004). L'action de ces différentes enzymes conduit à une oxydation des HAP (par l'oxygène ou le peroxyde d'hydrogène) en quinone, qui ensuite, par une cassure du cycle aromatique, produit des composés pouvant intégrer le catabolisme bactérien (Cerniglia 1992; Peng et al. 2008). Parmi les espèces de champignons ligninolytiques décrites comme capables de dégrader les HAP selon l'action de ces enzymes, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* et *Trametes versicolor* sont les plus étudiées (Gupta et al. 2015).

1.4.2.1.2.2 Les champignons non-ligninolytiques

Chez ce groupe de champignons, la première étape d'oxydation des HAP y est réalisée par la cytochrome P450 mono-oxygénase. Il s'agit d'une enzyme impliquée dans la détoxification de xénobiotiques, que l'on peut également retrouver chez d'autres organismes tels que des bactéries et même chez certains mammifères. Dans la voie catabolique décrite chez ces champignons, après l'insertion d'un atome d'oxygène par la cytochrome P450, la molécule de HAP époxyde peut soit subir un arrangement non enzymatique et être converti en phénol, ou alors subir l'action d'une époxyde hydrolase qui conduit à la production d'un HAP trans-dihydrodiol, pouvant ensuite être utilisé par les bactéries (Cerniglia 1992; Peng et al. 2008). Ce mécanisme de détoxification des HAP, principalement décrit chez *Cunninghamella elegans*, peut être également observé chez d'autres groupes fongiques (Peng et al. 2008; Gupta et al. 2015).

1.4.2.2 **Cas des HAP de haut poids moléculaire**

Ces molécules de haut poids moléculaire, présentant une importante hydrophobicité, sont davantage adsorbées à la matrice du sol que les HAP légers (Styrishave et al. 2012) et sont donc moins facilement accessibles à la biodégradation microbienne. Toutefois, différentes espèces et consortia bactériens capables de dégrader des HAP à 4 cycles ont été identifiés, ce qui a permis de proposer des voies cataboliques pour ces molécules persistantes dans l'environnement (Kanaly and Harayama 2000). Par exemple, *Mycobacterium* est une espèce bactérienne fortement impliquée dans la dégradation des HAP de haut poids moléculaire, notamment le fluoranthène et le pyrène. Ce dernier composé a été décrit comme pouvant être utilisé comme seule source de carbone et d'énergie pour la croissance bactérienne (Grosser et al. 1991). Une variété de souches de *Mycobacterium* capables de dégrader le pyrène a également été identifiée (Peng et al. 2008). De plus une voie de dégradation a été proposée

pour le pyrène et le fluoranthène chez la souche *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (Cerniglia 1992). La dégradation de ce composé a également été indiquée par un consortium bactérien isolé à partir d'un sol contaminé à la créosote (Mueller et al. 1989). Les voies cataboliques de la dégradation bactérienne du fluoranthène ont pu ainsi être décrites. D'autres études ont également montré l'implication de différentes souches bactériennes appartenant à l'espèce *Beijerinckia* dans la dégradation du benzo(a)anthracène (Gibson et al. 1975; Mahaffey et al. 1988). Par ailleurs, l'implication de bactéries appartenant aux espèces *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Flabobacterium* dans la dégradation de HAP à 4 cycles a également été mise en évidence (Kanaly and Harayama 2000).

Alors que les HAP à 4 cycles peuvent être dégradés grâce au métabolisme bactérien, la dissipation des HAP plus complexes à 5 ou 6 cycles ferait intervenir essentiellement des associations de microorganismes (consortium de bactéries associées ou non à des champignons) dans le cadre du co-métabolisme (Juhasz and Naidu 2000). Bien que la dégradation microbienne de ces composés soit peu renseignée, quelques études se sont intéressées à la biodégradation du benzo(a)pyrene (Kanaly and Harayama 2000). Une voie de dégradation de ce HAP a notamment été proposée chez *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 qui possède la capacité de l'oxyder grâce à des mono- et dioxygénases et de produire un métabolite complexe à 4 cycles proche du pyrène. Par ailleurs, l'utilisation de consortium bactérien provenant de site industriel historiquement contaminé a montré des résultats prometteurs quant à la dégradation de HAP de haut poids moléculaire d'un autre sol contaminé, induisant une dégradation plus importante que celle obtenue par la communauté endogène du sol étudié et atteignant près de 33, 25 et 18 % pour le benzo(a)anthracène, le benzo(a)pyrene et le dibenzo(a,h)anthracène, respectivement en 90 jours (Juhasz et al. 2000). De plus la préparation de consortium artificiel, impliquant des souches bactériennes et fongiques isolées à partir de sols de friches industriels différents, et qui présentent des capacités de dégradations complémentaires peut permettre de favoriser la dégradation de HAP de haut poids moléculaires, alors que ces souches ne pouvaient pas les dégrader en culture pure (Boonchan et al. 2000).

1.4.2.3 Cas de la contamination complexe des sols

Bien que la caractérisation des mécanismes de dégradation microbienne des HAP ait été principalement réalisée en condition simplifiée, en étudiant la biodégradation de composés uniques par des microorganismes en culture pure, il est important de considérer le fait que la

pollution environnementale est plus complexe et impacte les communautés microbiennes dans leur globalité. En effet, dans le sol la pollution est constituée par un mélange de HAP pouvant présenter différents niveaux d'hydrophobicité et de réactivité (Biache et al. 2008; Cébron et al. 2011a; Mukherjee et al. 2014). Ainsi, la dégradation de cette contamination complexe dans un sol doit impliquer des interactions métaboliques de types compétitives ou associatives entre les communautés bactériennes et fongiques. En effet il a été montré que l'ajout d'un HAP de faible poids moléculaire dans un système pouvait favoriser la dégradation d'un HAP de plus haut poids moléculaire. C'est le cas par exemple dans une étude de Juhasz et al. (1997), où la dégradation de certains HAP à 4 cycles (benzo(a)anthracène et dibenzo(a,h)anthracène) par une culture pure de *Burkholderia cepacia*, a été favorisée par l'ajout de phénanthrène. La dégradation microbienne des HAP dans les sols impliquerait différentes communautés, présentant des capacités de dégradation variées et complémentaires, et intervenant de manière transitoire dans le temps (Cerniglia 1992). Ainsi certaines populations pourraient permettre le développement d'autres populations en dégradant une molécule qui leur est toxique ou en produisant un métabolite intermédiaire qu'elles peuvent utiliser comme source de carbone.

La dégradation de molécules de HAP de haut poids moléculaire impliquerait sans doute l'intervention successive des communautés fongiques et bactériennes. De tels consortia bactéries-champignons, favorisant la dégradation notamment de HAP de haut poids moléculaire, ont déjà fait l'objet d'études (Li et al. 2008; Boonchan et al. 2000; Jacques et al. 2008). Ces communautés peuvent également mettre en place des interactions métaboliques antagonistes et entrer en compétition pour les ressources nutritives du milieu, comme ont pu le montrer Thion et al. (2012b) lors d'une expérience de biodégradation de HAP avec un champignon (*Fusarium solani*) et une bactérie (*Arthrobacter oxydans*) en co-culture.

Contrairement aux conditions optimales de croissance que l'on peut contrôler lors de l'étude de la dégradation des HAP par des cultures pures au laboratoire, les activités enzymatiques et la diversité des microorganismes peuvent être soumises dans un sol à différents facteurs environnementaux tels que l'humidité, la température, le pH et les ressources en nutriments (§1.1.2) ce qui peut indirectement entraîner une variabilité de l'efficacité de biodégradation microbienne (Haritash and Kaushik 2009; Pandey et al. 2009; Gupta et al. 2015). Ainsi, dans les sols *in situ* l'identification des microorganismes actifs et les voies métaboliques mises en œuvre dans la dégradation des HAP restent encore largement à explorer. Par ailleurs, comme

il a été présenté au paragraphe §1.2.2, la présence d'un couvert végétal peut impacter notamment ces différents paramètres, et donc avoir des conséquences sur le potentiel de dégradation des HAP par la communauté microbienne du sol.

1.4.2.4 Production de biosurfactant

Certaines bactéries, telles que *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*, possèdent la capacité à sécréter des molécules biosurfactantes (par exemple les rhamnolipides et les surfactines), qui augmentent la biodisponibilité des HAP dans le sol, favorisant leur accessibilité aux bactéries pouvant les dégrader (Johnsen et al. 2005; Fernández-Luqueño et al. 2011). Ces molécules dites amphiphiles présentent une partie hydrophobe et une partie hydrophile, ce qui facilite le transfert des HAP de la phase solide du sol où ils sont adsorbés à la phase liquide, où ils peuvent être plus facilement dégradés (Kuiper et al. 2004). Cependant certaines études ont également montré que l'augmentation de la teneur en HAP dans le milieu par ces molécules pouvait entraîner davantage de toxicité pour les populations microbiennes et ainsi inhiber leur dégradation (Cerniglia 1997; Carmichael and Pfaender 1997).

1.4.3 Dégradation des HAP dans la rhizosphère

1.4.3.1 La rhizoremédiation

D'abord mise en œuvre pour extraire la contamination en métaux lourds, la phytoremédiation, ou l'utilisation des plantes et des microorganismes associés pour réduire la concentration en polluants dans les sols, a peu à peu été envisagée pour traiter également des pollutions en composés organiques tels que les HAP. Il s'agit d'une pratique de remédiation *in situ* peu coûteuse, qui ne nécessite pas forcément au préalable l'excavation du sol, et qui regroupe un certain nombre de techniques (**Figure 1.14**). La rhizoremédiation est une technique de phytoremédiation (**Figure 1.14**) qui utilise la capacité des microorganismes à dégrader les polluants des sols grâce aux interactions positives qu'ils entretiennent avec les plantes au sein de la rhizosphère (Chaudhry et al. 2005). Elle peut ainsi s'appliquer pour les sols contaminés par des polluants organiques tels que les HAP.

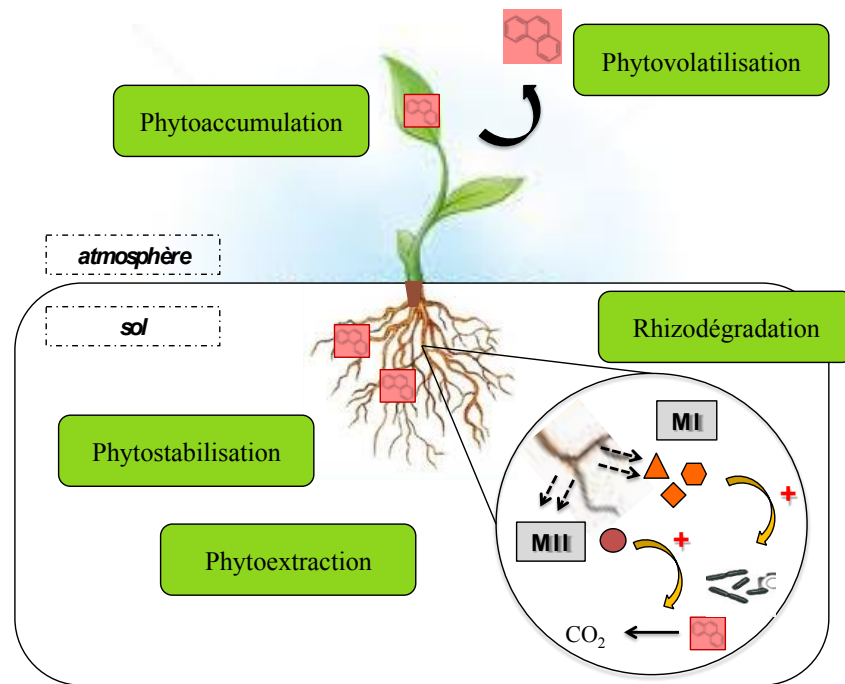


Figure 1.14. Les différentes voies de phytoremédiation des polluants dans les sols (MI : métabolites primaires, MII : métabolites secondaires (d'après Alagic et al. 2015).

1.4.3.2 Augmentation de la dégradation des HAP par la rhizosphère

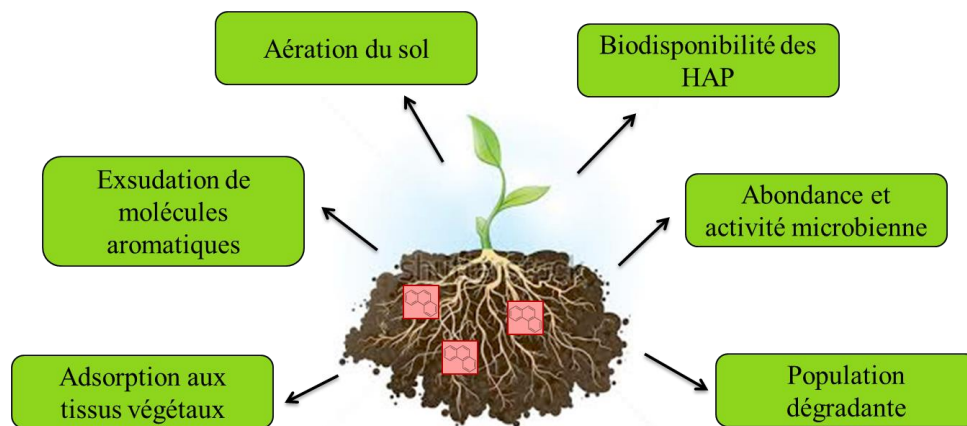


Figure 1.15. Les différents modes d'actions de la rhizosphère sur la dégradation des HAP (d'après Alagic et al. 2015).

L'effet de la rhizosphère sur la biodégradation des HAP a davantage été étudiée *ex situ* à partir de sol contaminé artificiellement au laboratoire (Liste and Alexander 2000; Binet et al. 2001; Joner et al. 2002; Chiapusio et al. 2007) que *in situ* sur des sols historiquement contaminés (Tejeda-Agredano et al. 2013; Xiao et al. 2015; Cébron et al. 2011a).

Toutefois ces deux approches ont permis de mettre en évidence, à travers de nombreuses études, que la dégradation des HAP était plus importante dans un sol planté ou rhizosphérique que dans un sol non planté (Aprill and Sims 1990).

Le développement du système racinaire peut réduire la teneur en HAP d'un sol par plusieurs mécanismes (Alagić et al. 2015; Bisht et al. 2015) (**Figure 1.15**). Tout d'abord, la croissance et la mort des racines aèrent le sol, ce qui facilite la dégradation des HAP par oxydation. De plus, les HAP peuvent également être piégés dans les tissus végétaux et s'adsorber à la surface des racines (Fismes et al. 2002; Gao and Zhu 2004). Ainsi Binet et al. (2000) ont montré que des associations avec les champignons mycorhiziens pouvaient aider les plantes à se développer sur un sol contaminé en diminuant notamment l'adsorption de l'antracène aux racines et en limitant sa concentration dans les parties aériennes de la plante. En plus de favoriser la dégradation des HAP, les plantes peuvent également agir, à travers leur système racinaire, comme un filtre et limiter leur propagation dans les nappes souterraines (processus de phytostabilisation) (Leroy et al. 2015).

D'autre part, comme décrit au paragraphe §1.4.2.1, les racines exsudent une grande variété de molécules organiques comprenant des acides organiques, tel que l'acide citrique, qui peut favoriser la désorption des HAP à la matrice du sol et ainsi augmenter leur extractibilité et biodisponibilité (Gao et al. 2015; Ling et al. 2009; Ling et al. 2015). En effet ces acides organiques, sont capables de dissoudre les cations métalliques, impliqués dans la séquestration de la matière organique aux particules minérales du sol, induisant ainsi sa libération et donc celle des HAP qui lui sont adsorbés (Gao et al. 2010). L'exsudation racinaire permet également une pré-exposition des communautés microbiennes de la rhizosphère à des molécules ayant une structure aromatique analogue à celle des HAP et l'activation des systèmes enzymatiques propices à leur dégradation (Siciliano and Germida 1998). La libération au niveau racinaire d'enzymes végétales également impliquées dans les voies cataboliques, telle que des peroxydases et des laccases, permet indirectement d'augmenter la dégradation des HAP (Haritash and Kaushik 2009; Gramss et al. 1999) au sein de la rhizosphère. De plus, le développement racinaire induit la production de métabolites secondaires, qui augmentent la biodisponibilité des HAP dans le sol, notamment par leur propriété biosurfactante (Joner et al. 2002; Joner and Leyval 2003; Sun et al. 2013; Zhou et al. 2011; Pandey et al. 2009), et les rendent ainsi plus accessibles pour la biodégradation microbienne. Une étude récente a par exemple montré que la production de mucilage,

induisant la libération de molécules biosurfactantes comme intermédiaires, au niveau des racines d'une légumineuse, favorisait la minéralisation du phénanthrène (Sun et al. 2015). Outre leur utilisation comme co-métabolites lors de la biodégradation microbienne, les molécules de signalisation peuvent également induire la production d'enzyme de détoxification, telle que la cytochrome P450-monooxygénase, impliquée dans la dégradation des HAP chez certains microorganismes (§1.3.2.1.2.2) (Wenzel 2009; Singer et al. 2003).

Dans les sols anthropisés, où la pollution sélectionne une communauté microbienne adaptée, l'efficacité de la phytoremédiation est également liée au potentiel que possède les plantes à structurer ces communautés microbiennes (Bell et al. 2014b). Les mêmes auteurs ont montré que la composition des communautés fongiques dans un sol contaminé aux hydrocarbures était impactée simultanément par l'espèce végétale et le degré de pollution (Bell et al. 2014a). Des résultats similaires ont été décrits par d'autres auteurs, (Yergeau et al. 2014; Peng et al. 2015) qui ont observés que l'augmentation de l'abondance des gènes de dégradation était liée au niveau de contamination dans la rhizosphère. De la même manière, Storey et al. (2014) ont observé que l'effet de la pollution pouvait être plus impactant que l'effet rhizosphère sur les communautés bactériennes. Dans un environnement similaire, contaminé au pétrole où des essais de phytoremédiation ont été menés, Kirk et al. (2005) ont montré que les plantes modifiaient la structure des communautés microbiennes dominantes, et augmentaient le nombre de microorganismes dégradeurs cultivables.

La mise en place d'essais de rhizoremédiation des HAP a également permis de mettre en évidence des modifications au niveau de la structure des communautés microbiennes. Par exemple, au cours d'une expérimentation en pots visant à étudier l'impact d'une contamination en pyrène sur les communautés bactériennes de la rhizosphère de légumineuses et d'herbacées, Kawasaki et al. (2012) ont montré que les taxa *Verrucomicrobia* et *Actinobacteria* étaient dominants. Des résultats similaires ont été observés *in situ*, où la présence de végétation sur un sol contaminé historiquement aux HAP favorisait en outre un enrichissement en *Alpha*, *Beta*, *Gamma-proteobacteria*, en *Firmicutes* et en *Chloroflexi* en comparaison avec le sol non planté (Cébron et al. 2009). Au sein de ce même dispositif de parcelles *in situ*, le développement d'une végétation spontanée et diversifiée favorisait également une plus grande abondance et diversité des populations fongiques par rapport au sol nu (Thion et al. 2012a). D'autre part, les mêmes auteurs ont pu observer que l'ajout d'exsudats artificiels de ray-grass sur un sol contaminé au phénanthrène, augmentait la

diversité bactérienne et favorisait les genres *Pseudomonas* et *Arthrobacter* (Cébron et al. 2011b). L'augmentation de la biodisponibilité du polluant *via* les exsudats racinaires serait un des facteurs par lequel la présence de plantes dans les sols contaminés modifierait la structure des communautés microbiennes (Wei et al. 2014).

La sélection d'une population capable de dégrader les HAP au sein de la rhizosphère de sol pollué a largement été décrite dans la littérature (Kuiper et al. 2004; Gerhardt et al. 2009; Khan et al. 2009). Plusieurs études ont montré qu'à travers la libération des exsudats racinaires, les plantes favorisaient la dégradation des hydrocarbures en modifiant la composition de la population fonctionnelle. Ce phénomène a principalement été mis en évidence en quantifiant l'abondance des gènes cataboliques dans les sols contaminés, et notamment les HAP dioxygénases, en présence ou non de plante. Au cours de l'étude *in situ* de l'atténuation naturelle d'une contamination historique en HAP, Cébron et al. (2009) ont montré que la population dégradante (HAP dioxygénase) était dominée par des bactéries à Gram-positif et que dans la rhizosphère cette population était favorisée, tout comme la diversité et l'abondance microbienne. Des résultats similaires ont été présentés par Storey et al. (2014), dans une expérience en microcosme visant à étudier l'effet des plantes sur une contamination artificielle en fluoranthène et les communautés microbiennes. D'autre part, une étude récente a également indiqué une augmentation de la dégradation des HAP en présence de plantes, grâce à l'action de molécules biosurfactantes, qui augmentent l'abondance des bactéries dégradantes à Gram-positif (Blyth et al. 2015). L'augmentation préférentielle des bactéries dégradantes à Gram-positif (*Actinobacteria*) n'est pas sans intérêt puisqu'elles seraient capables d'augmenter la biodisponibilité des HAP grâce à la formation de biofilm (Johnsen and Karlson 2004). Récemment, l'impact positif des plantes sur la sélection de populations microbiennes fonctionnelles dans des sols contaminés aux hydrocarbures a également été observé en quantifiant l'expression d'autres gènes de dégradation codant par exemple pour des mono-oxygénases, des laccases et des oxydases, et en identifiant les communautés associées (Pagé et al. 2015).

En plus d'augmenter l'abondance des populations bactériennes, impliquées dans la dégradation de HAP, les végétaux permettraient d'en favoriser la diversité (Sipila et al. 2008; Tejeda-Agredano et al. 2013). Toutefois il est important de mentionner que dans ces sols contaminés, l'augmentation de l'abondance des gènes de HAP dioxygénases varie fortement selon le type de sol (Ding et al. 2010) et selon l'espèce végétale utilisée (Siciliano et al. 2003).

1.4.3.2.1 Effets contrastés de la rhizosphère sur les HAP

Plusieurs études ont comparé l'efficacité de différentes plantes sur la dissipation des HAP dans les sols (D'Orazio et al. 2013; Phillips et al. 2008; Kuiper et al. 2004; Olson et al. 2007). Selon l'espèce végétale cultivée, les essais de rhizoremédiation des HAP ont montré des résultats plus ou moins prometteurs (Liste and Prutz 2006). Globalement, une plante est adaptée à la phytoremédiation selon sa capacité à se développer sur un milieu pauvre en nutriments, notamment grâce à un système racinaire dense qui permet d'explorer les ressources nutritives du sol. Plusieurs études ont mis en évidence l'intérêt du ray-grass et de la luzerne pour favoriser la dégradation des HAP dans les sols et stimuler la croissance de communautés dégradantes dans la rhizosphère (Khan et al. 2009; Muratova et al. 2003; D'Orazio et al. 2013).

Les différences d'efficacité de dégradation observées entre les espèces végétales sont attribuées en partie à la variabilité des communautés microbiennes sélectionnées au sein de leurs rhizosphères, et de leurs endosphères (Phillips et al. 2008). En effet, Siciliano et al. (2003) a montré que la communauté microbienne active, caractérisée par l'abondance de certains gènes cataboliques, au sein de la rhizosphère était dépendante de l'espèce végétale. D'autre part, pour une même espèce végétale des différences de dégradation des HAP ont pu être observées selon les caractéristiques physico-chimiques du sol (Chiapusio et al. 2007). Xiao et al. (2015) ont montré l'intérêt d'une graminée (*F. arundinacea*) qui a permis une dégradation des HAP plus importante que les autres végétaux grâce à sa faculté à augmenter la biodisponibilité du phosphore et la capacité d'échange cationique du sol (CEC). Ainsi l'association de plusieurs espèces végétales, aux compétences complémentaires pourrait présenter un intérêt pour la rhizodégradation des HAP, qui est plus importante en co-culture qu'en monoculture (Sun et al. 2011; Somtrakoon et al. 2014).

Bien que la littérature décrive globalement un effet positif des végétaux sur la dissipation des HAP dans les sols, il existe quelques études aux résultats moins prometteurs. Par exemple, dans le cadre d'une étude en microcosme à partir de sol historiquement contaminé, avec ajout de phénanthrène, Cébron et al. (2011b) ont montré que bien que l'ajout d'exsudats racinaires favorisait l'abondance des gènes codant les HAP dioxygénases, il ne favorisait pas la dégradation du polluant. Par ailleurs, dans une étude en condition simplifiée, qui visait à suivre la dégradation du phénanthrène dans du sable, Louvel et al. (2011) ont observé une dégradation du phénanthrène plus faible et une population bactérienne dégradante moins

active lors de l'ajout d'exsudats synthétiques de ray-grass. Une dégradation des HAP moindre en présence de plante a également été observée en quantifiant les gènes de catéchol et de naphthalène dioxygénases dans un sol historiquement contaminé, en présence de deux espèces végétales différentes (Phillips et al. 2012). Dans cette étude, la capacité dégradante de la communauté microbienne était favorisée ou non en fonction de la composition des exsudats racinaires.

Ces résultats peuvent être expliqués par des phénomènes de préférence et/ou d'inhibition métabolique. En effet dans des environnements relativement pauvres, comme les sols pollués, la sécrétion d'exsudats racinaires constitue pour les populations microbiennes une source de carbone plus facilement dégradable que les HAP. Le choix métabolique préférentiel des microorganismes pour ces sources de carbone labile pourrait expliquer la dégradation plus faible du polluant en présence de plante. Une diminution de l'activité dioxygénase a aussi été montrée en ajoutant du glucose dans le milieu de culture d'une souche de *Pseudomonas* dégradante (Tian et al. 2003). Par ailleurs, *via* la capacité des végétaux à désorber les molécules de HAP de la matrice du sol et à augmenter leur biodisponibilité, une augmentation transitoire de la teneur en HAP dans les sols plantés a pu être observée, probablement avant la mise en œuvre des processus de biodégradation microbienne (Liste and Prutz 2006), pouvant potentiellement augmenter la toxicité du milieu. Le développement des végétaux dans ces sols pollués pourrait créer davantage d'hétérogénéité, de par la formation de micro-niches et la variabilité spatio-temporelle des processus rhizosphériques. En effet, dans la rhizosphère, la dégradation des HAP ne semble pas homogène. Par exemple, en fonction de la distance aux racines, Corgié et al. (2003) ont montré une variabilité spatiale de la dégradation des HAP, avec une dissipation plus importante au plus près des racines et un ralentissement de la dégradation dans les zones plus éloignées. D'autres études ont également révélé l'existence d'un gradient de concentration en HAP (Ma et al. 2012a; Ling et al. 2013), de la communauté bactérienne (Corgié et al. 2004) et bactérienne dégradante (Ma et al. 2015), au sein de la rhizosphère de différentes plantes. Toutefois ces phénomènes ont été jusqu'ici peu décrits et doivent encore être précisés.

Les résultats contrastés, concernant l'efficacité de la rhizoremédiation des HAP dans les sols, suggèrent que les processus impliqués dans l'effet rhizosphère doivent être encore précisés, notamment dans les sols historiquement pollués où la contamination est complexe et faiblement disponible. La variabilité spatiale et temporelle des interactions biologiques et des

différents processus au sein de la rhizosphère pourrait être à l'origine des résultats contrastés obtenus lors des essais de rhizoremédiation des HAP.

1.5 Objectifs de la thèse

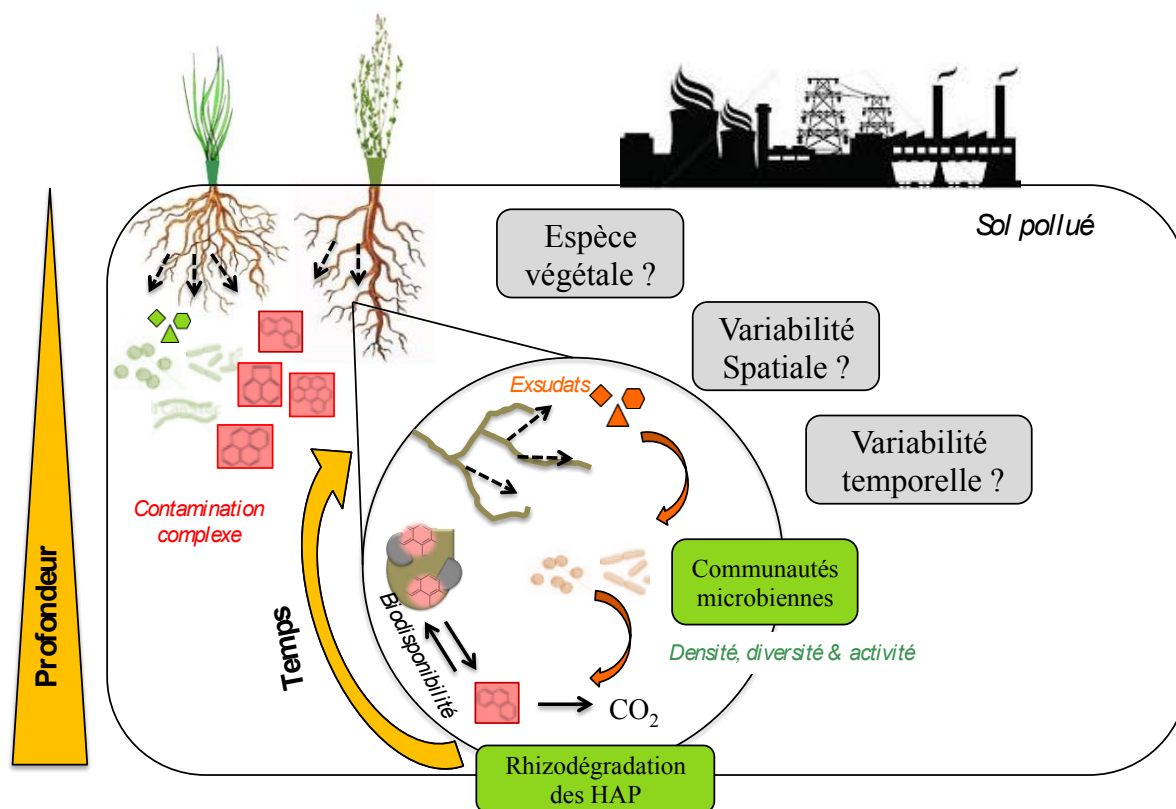


Figure 1.16. Variabilité spatio-temporelle du devenir des HAP dans les sols industriels sous couvert végétal.

Dans un souci de remédier à la pollution des sols en HAP, différentes technologies utilisant le développement de végétaux sont envisagées. Toutefois la compréhension des mécanismes impliquant la biodégradation de ces polluants, en présence de végétaux, n'est pas encore complète. En effet, la mise en œuvre de ce type de technologie peut susciter des questions quant à la variabilité des résultats rapportés dans la littérature. L'analyse bibliographique sur le sujet montre la nécessité, pour améliorer la compréhension des processus qui contrôlent le devenir des HAP dans la rhizosphère, de les étudier dans des conditions complexes, de prendre en compte l'hétérogénéité des HAP, la variabilité des processus rhizosphériques, et le lien entre la diversité et l'activité microbienne et le devenir des HAP (Figure 1.16).

Mes travaux de thèse ont pour objectifs de prendre en compte la variabilité spatio-temporelle (i) de la diversité microbienne, ainsi que (ii) des teneurs en HAP et de leur biodisponibilité

dans la rhizosphère d'un sol historiquement contaminé, afin de mieux comprendre le devenir de ces contaminants dans la rhizosphère, en lien avec la dynamique des communautés impliquées dans leur biodégradation. Pour répondre à ces objectifs des expérimentations ont été menées à des échelles de temps (semaines, mois, années) et d'espaces (centimètre, mètre) différentes, en utilisant des dispositifs de type microcosmes et sur le terrain, à partir d'un sol de friche industrielle historiquement contaminé.

Tout d'abord, afin de comprendre l'impact de la variabilité spatiale à l'échelle centimétrique de la rhizosphère sur l'hétérogénéité des HAP, une première étude a été réalisée en rhizotron sur une durée de 1 mois. Ce dispositif a été conçu pour visualiser le développement racinaire au cours de la croissance végétale et prélever des échantillons précisément à différentes profondeurs, en considérant l'intégralité du système racinaire de la plante. Au cours de cette étude, nous avons choisi de comparer deux espèces végétales présentant des systèmes racinaires contrastés, la luzerne et le ray-grass. Ces deux plantes sont couramment utilisées dans des essais de rhizodégradation des HAP, car elles présentent peu d'exigences nutritives et une croissance suffisante sur les sols pollués. Un sol de friche industrielle historiquement contaminé par des HAP, présentant des communautés microbiennes adaptées à la contamination, a été utilisé. Cependant la biodisponibilité des HAP dans ce sol étant très faible, le suivi de la dégradation est difficile sur une échelle de temps d'étude au laboratoire, c'est pourquoi une recontamination fraîche par un extrait organique complexe provenant du même sol a été réalisée. Après 1 mois de croissance végétale, une analyse multiparamétrique a permis de caractériser la structure spatiale de la teneur en HAP totaux et biodisponibles et l'abondance des communautés microbiennes totales et dégradantes au sein de la rhizosphère de ces deux plantes. L'ensemble de ces données a été modélisé grâce aux géostatistiques afin de mettre en relation la spatialisation de ces paramètres avec celle du système racinaire (**Chapitre 3**). Cette première étude a ensuite été complétée, en étudiant et en comparant la variabilité spatiale de la diversité bactérienne au sein de ces deux rhizosphères (**Chapitre 4**).

Ensuite, afin de préciser la cinétique de dégradation des HAP dans la rhizosphère, une deuxième étude en rhizotron a été menée en développant un nouveau microcosme complémentaire du premier. Cette deuxième expérimentation a été réalisée à l'échelle du système racinaire global (cm) sur une durée d'un mois, avec un prélèvement par semaine, représentant 4 temps de prélèvement. L'espèce végétale qui, dans la première étude présentait la capacité de dégradation la plus importante et une spatialisation des communautés

bactériennes avec la profondeur, la luzerne, a été choisie pour cette deuxième expérimentation. Les dispositifs plantés ont été comparés à des dispositifs non-plantés afin de mettre en évidence dans cette expérience l'influence directe de la rhizosphère. L'évolution des teneurs en HAP totaux et biodisponibles, des paramètres rhizosphériques et des communautés microbiennes totales et actives (estimées à partir du nombre de gènes et de transcrits) a été étudiée au cours du temps en comparant les rhizotrons plantés et non plantés (**Chapitre 5**).

Enfin dans une dernière étude, menée *in situ* sur un dispositif de parcelles expérimentales de longue durée, nous avons cherché à caractériser à l'échelle métrique, l'évolution à long terme (6 ans) de la diversité des communautés bactériennes et fongiques, en condition d'atténuation naturelle sous couvert végétal (luzerne), d'une contamination historique en HAP (**Chapitre 6**).

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

2. Matériels et méthodes

2.1 *Le sol et les parcelles*

2.1.1 Historique

Le sol utilisé au cours des différents travaux provient de l'ancienne cokerie-acierie de Neuves-Maisons (NM) (Lorraine, France). La multi-contamination aux métaux lourds et en HAP de la terre résulte d'une activité industrielle importante, ayant duré près de 100 ans. Un prélèvement de terre sur ce site a été effectué en octobre 2004 et stocké sur le site du GISFI (station expérimentale du GISFI (www.gisfi.fr), le Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles) à Homécourt (Lorraine, France). Une partie de ce prélèvement a été criblée et utilisée pour mettre en place des parcelles lysimétriques en septembre 2005 puis a été séparée en différents lots pour répondre aux besoins des différentes études. Mes travaux ont porté, d'une part, sur des prélèvements effectués au cours du temps sur le dispositif de parcelles lysimétriques dans le cadre de projets précédents financés par les programmes EC2CO et ANR (ANR-2008-CESA-010, Multipolsite) et, d'autre part, sur des expérimentations en microcosmes de type rhizotron avec un lot de cette même terre stocké sur le site d'Homécourt (lot Oxysol, 2008). La terre des lots et des parcelles présentant des caractéristiques physico-chimiques sensiblement différentes, celles-ci sont donc présentées séparément dans les paragraphes suivants.

2.1.2 Les parcelles lysimétriques

En Septembre 2005, 24 cuves en acier de 6m² (1 2 m x L 3 m x p 0,4 m) ont été installées à Homécourt sur le site du GISFI. Ce dispositif comporte 20 parcelles contenant du sol de NM non traité et 4 parcelles contenant le même sol traité par désorption thermique (volatilisation des polluants organiques par chauffage du sol à une température entre 400 et 600°C), préalablement tamisé à 40 mm, plantées ou non. Un dispositif de collecte des eaux de drainage de chaque parcelle a également été mis en place (Ouvrard et al. 2011). Chaque condition réalisée en 4 réplicats a été distribuée aléatoirement sur le dispositif. Après un premier prélèvement effectué à la mise en place des parcelles (T0 en septembre 2005), l'échantillonnage a été poursuivi 2 fois par an en mai et en septembre. Chaque prélèvement, constitué d'un échantillon moyen regroupant 6 prélèvements sur la parcelle à la tarière de 30 cm de profondeur, a été tamisé à 5 mm et sous-échantillonné puis stocké à -80°C en vue de réaliser des analyses de biologie moléculaire.

Le suivi de ce dispositif a été réalisé sur 7 ans, cependant au cours de mes travaux nous nous sommes intéressées à l'évolution des paramètres physico-chimiques du sol, de l'abondance et de la diversité bactérienne et fongique sur :

- deux des 6 traitements étudiés sur le site et présentés dans la **Figure 2.1**, qui concernaient la terre NM: NM-BS, la terre nue où l'absence de végétation a été maintenue par un désherbage manuel, et NM-Msm, la terre plantée avec de la luzerne (*Medicago sativa*) inoculée avec deux espèces de champignons mycorhiziens (*Glomus mosseae* et *Glomus intraradices*). Pour chacune des deux conditions trois des quatre parcelles ont été suivies (**Figure 2.1**).
- à trois temps différents : le temps initial (T0), après 2 ans (T4, septembre 2007), et 6 ans (T12, septembre 2011) de mise en place des parcelles.

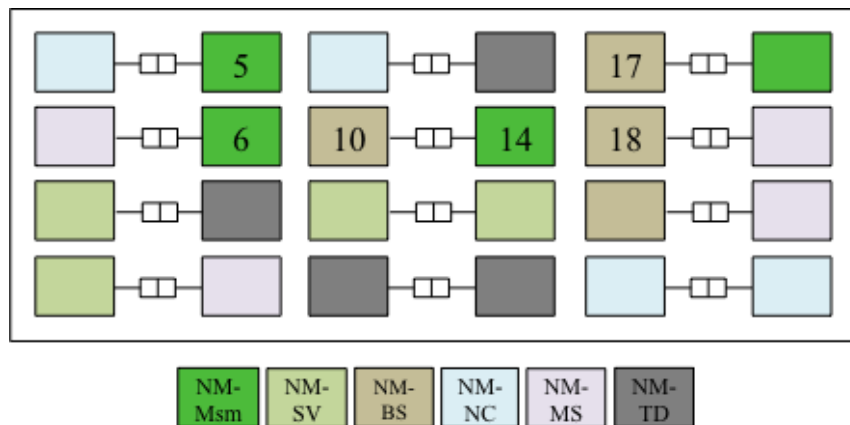


Figure 2.1. Répartition des différents traitements sur les parcelles lysimétriques installées à Homécourt (54). Six différents traitements ont été réalisés à partir de la terre de Neuves-Maisons (NM) en 4 réplicats: Msm: luzerne mycorhizée par *Glomus mosseae* et *Glomus intraradices*, SV: végétation spontanée, BS: sol nu, NC: semis de plantes hyperaccumulatrices de métaux, MS: luzerne mycorhizée, TD: sol thermo-désorbé et planté de luzerne mycorhizée. Au cours de cette thèse, les deux conditions NM-Msm et NM-BS ont été étudiées uniquement sur les parcelles numérotées.

Les caractéristiques physico-chimiques des terres des parcelles étudiées et prélevées aux 3 temps, sont présentées dans le **Tableau 2.1**. Globalement en 6 ans, le pH et le ratio C/N ont augmenté, et les teneurs en 16 HAP, Zn et en Mn extractibles ont diminué au cours du temps tandis que la concentration en métal total a augmenté au cours du temps. En condition plantée, la mycorhization des racines de luzerne n'a été observée qu'après 6 ans de culture ou elle atteignait 24%. Il faut également noter que les premières années la luzerne poussait correctement sur la terre avec une densité de colonisation et une biomasse importante alors qu'après 6 ans sur le site, la biomasse végétale était 15 fois plus faible.

Tableau 2.1. Evolution au cours du temps (T0, T4, T12) des caractéristiques physico-chimiques et biologiques de la terre NM des parcelles lysimétriques, nue (BS) et plantée avec de la luzerne mycorhizée (Msm).

Traitement Date	MsmT0 Septembre 2005	BST0	MsmT4 Septembre 2007	BST4	MsmT12 Septembre 2011	BST12
Humidité (%)	48,85 ± 7,83 ^b	44,74 ± 10,12 ^b	47,40 ± 5,81 ^b	58,65 ± 6,12 ^{ab}	64,37 ± 5,18 ^a	67,91 ± 3,89 ^a
Biomasse de luzerne (g)	0	0	1693,3 ± 156,3	0	109,0 ± 106,1	0
Mycorhization						
Colonisation racinaire (%)	nd	nd	0	nd	24,6 ± 10,1	nd
Arbuscules (%)	nd	nd	0	nd	15,6 ± 20,3	nd
Granulométrie (g.kg⁻¹)						
Argile (< 2 µm)	133 ± 20	121 ± 26	nd	nd	130 ± 8	145 ± 5
Limons fins (2/20 µm)	143 ± 26 ^{ab}	181 ± 26 ^a	nd	nd	126 ± 23 ^b	124 ± 8 ^b
Limons grossiers (20/50 µm)	71 ± 9	91 ± 15	nd	nd	63 ± 15	73 ± 10
Sables fins (50/200 µm)	77 ± 20	98 ± 11	nd	nd	62 ± 11	88 ± 15
Sables grossiers (200/2000 µm)	576 ± 48	508 ± 64	nd	nd	619 ± 42	570 ± 25
Paramètres agronomiques						
Azote total (g/Kg)	2,76 ± 0,14 ^a	2,73 ± 0,17 ^a	2,85 ± 0,07 ^a	2,51 ± 0,09 ^{bc}	2,66 ± 0,04 ^{ab}	2,40 ± 0,02 ^c
C/N	21,5 ± 0,7 ^b	22,2 ± 0,2 ^b	22,5 ± 0,8 ^b	23,5 ± 1,1 ^{ab}	25,4 ± 1,1 ^a	25,5 ± 1,7 ^a
Carbone organique (g/Kg)	59,23 ± 1,45	60,67 ± 4,02	64,13 ± 1,88	59,07 ± 4,68	67,47 ± 2,68	61,27 ± 3,58
Matière organique (g/Kg)	102,33 ± 2,31	105,00 ± 6,93	111,00 ± 3,46	102,17 ± 8,28	117,00 ± 4,58	106,00 ± 6,08
pH	6,72 ± 0,16 ^c	6,96 ± 0,14 ^c	7,15 ± 0,07 ^{bc}	7,26 ± 0,15 ^b	7,47 ± 0,04 ^a	7,59 ± 0,01 ^a
CaCO ₃ total (g/Kg)	14,83 ± 1,35 ^{ab}	18,40 ± 1,85 ^a	10,92 ± 1,29 ^b	13,93 ± 2,46 ^{ab}	10,10 ± 0,53 ^b	14,47 ± 3,86 ^{ab}
P ₂ O ₅ disponible (Olsen) (g/Kg)	0,040 ± 0,004 ^b	0,048 ± 0,003 ^{ab}	0,055 ± 0,006 ^a	0,058 ± 0,009 ^a	0,055 ± 0,006 ^a	0,061 ± 0,007 ^a
Éléments échangeables à l'acétate d'ammonium (cmol+/kg)						
Calcium (Ca)	217,3 ± 20,6	222,0 ± 12,8	197,3 ± 12,9	132,8 ± 110,4	233,3 ± 9,1	208,3 ± 12,4
Magnésium (Mg)	8,79 ± 0,50 ^a	8,71 ± 0,44 ^a	1,63 ± 0,09 ^c	2,60 ± 0,26 ^b	0,63 ± 0,43 ^d	0,66 ± 0,48 ^d
Potassium (K)	0,94 ± 0,02	1,03 ± 0,08	0,84 ± 0,05	0,84 ± 0,20	0,78 ± 0,05	0,66 ± 0,27
Métaux extractibles à l'EDTA (mg/Kg)						
Cuivre (Cu)	10,28 ± 1,78 ^c	9,85 ± 0,21 ^b	12,03 ± 1,10 ^b	12,70 ± 0,50 ^b	13,03 ± 0,06 ^b	15,47 ± 0,23 ^a
Fer (Fe)	82,00 ± 3,76 ^b	82,30 ± 4,71 ^b	97,00 ± 8,72 ^a	101,10 ± 4,25 ^a	99,83 ± 0,29 ^a	107,00 ± 3,00 ^a
Manganèse (Mn)	435,33 ± 19,40 ^a	359,00 ± 73,75 ^b	126,00 ± 9,54 ^c	72,20 ± 6,39 ^c	64,40 ± 2,01 ^c	73,37 ± 2,97 ^c
Zinc (Zn)	242,67 ± 3,79 ^a	242,67 ± 9,07 ^a	152,67 ± 16,01 ^c	170,67 ± 7,64 ^{bc}	154,33 ± 8,50 ^c	188,67 ± 16,20 ^b
Métaux totaux (mg/Kg)						
Bore (B)	9,2 ± 0,2 ^a	8,5 ± 0,3 ^b	5,4 ± 0,0 ^d	6,0 ± 0,2 ^c	3,8 ± 0,3 ^e	3,6 ± 0,1 ^e
Chrome (Cr)	659 ± 52 ^b	648 ± 24 ^b	784 ± 41 ^b	768 ± 84 ^b	1012 ± 62 ^a	1033 ± 75 ^a
Cuivre (Cu)	140,7 ± 14,2 ^{ab}	131,0 ± 5,6 ^b	157,3 ± 4,2 ^a	147,0 ± 2,0 ^{ab}	146,7 ± 3,5 ^{ab}	146,3 ± 6,7 ^{ab}
Zinc (Zn)	1927 ± 55 ^b	2000 ± 187 ^b	2307 ± 21 ^{ab}	2300 ± 226 ^{ab}	2197 ± 40 ^{ab}	2417 ± 224 ^a
Plomb (Pb)	441,0 ± 5,6 ^c	451,0 ± 35,3 ^c	610,3 ± 19,5 ^a	596,0 ± 32,1 ^a	491,7 ± 6,4 ^{bc}	545,3 ± 56,0 ^{ab}
HAP (mg/kg)						
Naphtalène	38,5 ± 3,7	76,0 ± 60,1	43,4 ± 12,8	25,4 ± 0,5	16,3 ± 3,2	17,0 ± 2,6
Acenaphtylène	54,3 ± 1,7 ^a	51,8 ± 5,5 ^a	48,5 ± 2,6 ^a	40,4 ± 1,0 ^b	25,7 ± 1,5 ^c	21,0 ± 3,0 ^c
Acénaphthène	59,8 ± 4,7 ^a	56,8 ± 10,1 ^a	54,9 ± 2,7 ^a	34,8 ± 1,6 ^b	37,7 ± 5,5 ^b	29,7 ± 6,5 ^b
Fluorène	54,4 ± 4,9 ^a	47,3 ± 9,9 ^a	56,0 ± 4,1 ^a	32,1 ± 3,3 ^b	37,7 ± 6,7 ^b	28,0 ± 4,6 ^b
Phenanthrène	151,8 ± 13,2 ^a	144,0 ± 29,8 ^{ab}	161,9 ± 11,7 ^a	106,6 ± 11,4 ^{bc}	130,0 ± 10,0 ^{abc}	100,7 ± 19,0 ^c
Anthracène	159,1 ± 9,6 ^c	135,3 ± 11,3 ^c	274,3 ± 14,7 ^a	226,9 ± 40,7 ^b	37,7 ± 4,5 ^d	30,3 ± 2,5 ^d
Fluoranthène	268,3 ± 37,2 ^a	262,7 ± 45,8 ^a	254,7 ± 13,9 ^a	184,2 ± 15,3 ^b	206,7 ± 11,5 ^{ab}	173,3 ± 23,1 ^b
Pyrène	194,3 ± 13,4 ^{ab}	188,3 ± 22,8 ^{ab}	212,2 ± 10,9 ^a	159,7 ± 15,9 ^{bc}	156,7 ± 11,5 ^{bc}	130,0 ± 17,3 ^c
Benzo (a)anthracène	146,3 ± 13,1 ^b	142,2 ± 16,2 ^b	172,2 ± 10,1 ^a	129,6 ± 11,9 ^b	116,7 ± 15,3 ^{bc}	98,3 ± 10,1 ^c
Chrysène	115,3 ± 10,8 ^{ab}	112,9 ± 13,5 ^{ab}	125,0 ± 6,6 ^a	93,7 ± 8,0 ^{bc}	96,3 ± 3,2 ^{bc}	80,3 ± 9,5 ^c
Indeno (1, 2, 3c-d) pyrène	126,9 ± 15,8 ^a	125,4 ± 10,2 ^a	122,0 ± 5,7 ^a	101,5 ± 5,8 ^b	77,0 ± 3,6 ^c	64,0 ± 7,9 ^c
Benzo (b) fluoranthène	179,2 ± 21,9 ^a	175,0 ± 15,7 ^a	138,3 ± 8,5 ^b	111,7 ± 6,9 ^c	64,7 ± 3,1 ^d	54,7 ± 5,5 ^d
Benzo (k)fluoranthène	62,3 ± 8,4 ^{cd}	64,4 ± 6,8 ^c	62,4 ± 3,2 ^{cd}	49,3 ± 3,3 ^d	97,7 ± 2,1 ^a	82,7 ± 9,0 ^b
Benzo (a)pyrène	150,2 ± 11,5 ^a	148,6 ± 12,7 ^a	166,8 ± 8,9 ^a	130,9 ± 8,7 ^b	23,7 ± 1,5 ^c	18,7 ± 3,1 ^c
Dibenzo (a,h)anthracène	25,9 ± 2,2 ^c	24,6 ± 1,5 ^c	29,8 ± 1,1 ^c	25,2 ± 1,2 ^c	71,0 ± 2,6 ^a	60,0 ± 7,0 ^b
Benzo (g,h,i)perylène	83,9 ± 9,3 ^a	83,7 ± 5,4 ^a	79,7 ± 3,8 ^{ab}	67,7 ± 3,6 ^{bc}	77,0 ± 3,6 ^{abc}	64,0 ± 7,9 ^c
Σ16 HAP (US-EPA)	1871 ± 147 ^a	1840 ± 262 ^a	2002 ± 101 ^a	1282 ± 314 ^b	1333 ± 58 ^b	1133 ± 153 ^b

2.2 Les microcosmes : Rhizotrons

2.2.1 Caractéristiques du sol

Le lot de terre NM, utilisé afin de réaliser les expérimentations en microcosmes, a aussi fait l'objet d'analyses physico-chimiques présentées dans le **Tableau 2.2**. Avant utilisation, la terre a été séchée à l'air et tamisée à 2 mm. La capacité de rétention en eau a été mesurée par humidification par capillarité et une pesée de la terre avant et après saturation en eau.

Tableau 2.2. Caractéristiques physico-chimiques du lot de terre de NM utilisé au cours des deux expérimentations en rhizotron. L'analyse des propriétés physico-chimiques a été réalisée au laboratoire LAS-INRA (Arras, France).

Granulométrie (g.kg⁻¹)	
Argile (< 2 µm)	108
Limons fins (2/20 µm)	114
Limons grossiers (20/50 µm)	78
Sables fins (50/200 µm)	89
Sables grossiers (200/2000 µm)	593
Caractéristiques agronomiques et chimiques	
Azote total (g.kg ⁻¹)	2,34
C/N	24,9
Carbone organique (g.kg ⁻¹)	58,2
Matière organique (g.kg ⁻¹)	101
pH	7,49
Capacité de rétention en eau totale (ml.g ⁻¹)	0,255
CaCO ₃ total (g.kg ⁻¹)	17
P ₂ O ₅ disponible (Olsen) (g.kg ⁻¹)	0,059
CEC cmol+.kg ⁻¹	9,83
Contamination (mg.kg⁻¹)	
Σ16 HAP (US-EPA)	1235 ± 176
Σ15 HAP biodisponibles	40 ± 13
Etude en rhizotron 1 : après recontamination	
Σ16 HAP (US-EPA)	1524 ± 174
Σ15 HAP biodisponibles	61 ± 15
Etude en rhizotron 2 : après recontamination	
Σ16 HAP (US-EPA)	1641 ± 223
Σ15 HAP biodisponibles	71 ± 22

2.2.2 Recontamination du sol

Dans les sols de friches industrielles, il a été montré que la biodégradation de la contamination historique en HAP était très lente en raison d'une faible biodisponibilité et qu'une dégradation plus rapide pouvait être observée lors de l'ajout d'une contamination fraîche (Cébron et al. 2011b; Cébron et al. 2013). Afin de pouvoir suivre au cours de nos expérimentations en microcosmes la biodégradation des polluants sur une courte durée, la

teneur en HAP biodisponibles et totaux a été augmentée artificiellement en ajoutant à la terre historiquement contaminée un extrait organique complexe provenant de la même terre (**Tableau 2.3**). La procédure de recontamination décrite permet l'obtention de 5 kg de terre recontaminée. L'extraction a été réalisée en ajoutant 2,47 l de chloroforme à 2,250 kg de terre NM dans un cristalliseur en verre, ce qui a permis après 1 heure en suspension d'obtenir 0,779 l d'un extrait concentré en polluant organique (**Tableau 2.3**), par la suite répandu sur 0,450 kg de terre NM. Après 2 jours d'aération sous une sorbonne avec homogénéisation régulière, la terre recontaminée a été mélangée selon un ratio 1/9 (m/m) avec la terre de NM afin d'augmenter la teneur en polluant tout en préservant les communautés microbiennes adaptées à la contamination historique. La terre recontaminée a été préparée selon cette procédure lors de la mise en place de deux études : afin d'étudier la variabilité spatiale (rhizotrons N°1) et temporelle (rhizotrons N°2) de la biodégradation des HAP et des communautés microbiennes dans la rhizosphère d'un sol multi-contaminé. Au cours de la deuxième étude, 18 kg de terre recontaminée ont été préparés puis séparés en 8 lots par quartage (Retsch PT100 C) afin de remplir les différents dispositifs. Pour plus d'homogénéité, avant mélange à la terre de NM, la terre recontaminée a été broyée finement grâce à des billes et des cellules d'acier, en utilisant une pulvérisette (Retsch MM200). Les caractéristiques de la terre NM avant et après recontamination (T0) pour les deux études sont présentées dans le **Tableau 2.2**.

Tableau 2.3. Teneur en HAP de l'extrait organique complexe préparé à partir de la terre de NM, lors de l'étude en rhizotron N°2.

Contamination (mg.l ⁻¹)		
Naphtalène		2,9 ± 0,4
Acénaphthylène		0
Acénaphène		0
Fluorène	2-3 cycles	24,8 ± 2,3
Phénanthrène		98,7 ± 4,2
Anthracène		35,9 ± 1,6
Fluoranthène		221,8 ± 16,7
Pyrène	4 cycles	200,9 ± 11,7
Benzo (a)anthracène		126,3 ± 12,2
Chrysène		101,1 ± 6,8
Indeno (1, 2, 3c-d) pyrène		101,7 ± 10,3
Benzo (b) fluoranthène		115,7 ± 10,8
Benzo (k)fluoranthène	5-6 cycles	70,7 ± 10,3
Benzo (a)pyrène		28,2 ± 7,6
Dibenzo (a,h)anthracène		70,3 ± 7,0
Benzo (g,h,i)perylène		77,2 ± 7,8
Σ16 HAP (US-EPA)		1276,2 ± 101,3

2.2.3 Microcosmes utilisés pour l'étude de la variabilité spatiale

2.2.3.1 Dispositif

Deux rhizotrons (p 30 x L 30 x l 2,5 cm) en PMMA (polyméthacrylate de méthyle), réalisés par la société Frans bonhomme (Metz, 57), possédant une face avant amovible recouverte de toile à bluter (maille 5 μm) pour permettre d'accéder au système racinaire sans l'altérer, ont été utilisés (**Figure 2.2**). Dans leur fond, les rhizotrons présentent 9 ouvertures de 4 mm de diamètres à 30 mm d'intervalle les unes des autres. Après avoir disposé un rectangle de toile à bluter (maille 5 μm), 180 g de sable de Fontainebleau ont été déposés au fond des dispositifs (représentant environ 3 cm) afin de faciliter le drainage. Ces deux rhizotrons ont été remplis de terre NM recontaminée. Puis les dispositifs ont été placés à 80% de la capacité de rétention en eau (CRE) de la terre, en ajoutant par le haut 203 ml d'eau déminéralisée stérile par kg de sol sec. Après 6 heures de stabilisation, deux espèces végétales différentes, la luzerne (*Medicago sativa* var. Europe) et le ray-grass (*Lolium multiflorum* var. Podium), ont été cultivées indépendamment dans chacun des deux rhizotrons en semant à la surface du sol 4 g de graines pour chacune des deux plantes, correspondant à environ 22 graines par cm^2 . Après 2 jours de germination, à l'obscurité et en atmosphère humide (dispositifs recouverts en surface de coton imbibé), les dispositifs ont été placés en chambre phytotronique selon des conditions contrôlées (22°C/18°C jour/nuit, 80% d'humidité, environ 250 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 heures d'éclairage) et maintenus à 80% de la CRE par des pesées quotidiennes et un arrosage à l'eau distillée, si nécessaire. Les dispositifs ont été protégés de la lumière, en les plaçant dans un bac fermé en surface et en les recouvrant de papier d'aluminium, pour ne laisser passer que les plantes et éviter le développement d'espèces algales.

2.2.3.2 Echantillonnage

Après 37 jours de croissance végétale, les deux rhizotrons ont été ouverts par la face amovible. L'utilisation d'une carte d'échantillonnage standardisée et spatialement codée a permis de prélever 56 échantillons (7 échantillons à 8 profondeurs) par dispositif avec une distance entre échantillon (de centre à centre) de 3 cm (**Figure 2.2**). Des prélèvements de terre d'environ 4 g, 1,6 cm de diamètre et 2,5 cm de long ont été réalisés à l'aide d'une seringue de 10 ml coupée et enfoncée horizontalement dans l'épaisseur du rhizotron. Le piston de la seringue a permis ensuite de déposer l'échantillon prélevé dans une microplaque de 12 puits (Corning 3512, Costar), où les racines ont été séparées de la terre puis rincées à trois reprises avec de l'eau milliQ stérile (3 ml.). Le sol rhizosphérique a été récupéré dans la première eau de rinçage, après une étape de centrifugation de 10 min à 4400 rpm pour éliminer l'eau et une

nuit de séchage à l'air. Cette fraction de sol rhizosphérique a été pesée afin de calculer des ratios par rapport à la quantité de « sol » total, lui aussi séché à l'air et pesé. Ces deux fractions de sol ont ensuite été mélangées pour obtenir un seul échantillon global, conservé à -80°C. Les racines ont été séchées à 60°C pendant 48 heures puis pesées pour chacun des 56 échantillons. Trois échantillons supplémentaires par profondeur ont été prélevés afin d'estimer l'humidité dans les deux dispositifs, par pesées avant et après séchage de la terre à 60°C pendant 48 heures. A partir de chacun des 56 échantillons, des extractions de HAP totaux et d'ADN génomique (ADNg) ont été réalisées. Des mesures de HAP biodisponibles, de pH, de carbone organique dissous, de sucres et de diversité bactérienne ont été effectuées uniquement sur 16 échantillons par dispositif suivant un maillage plus grossier, avec une distance entre échantillon de 6 cm (**Figure 2.2**). L'ensemble des mesures a été réalisée à partir de terre congelée à -80°C, exceptés les dosages de HAP biodisponibles qui ont été réalisés sur sol frais.

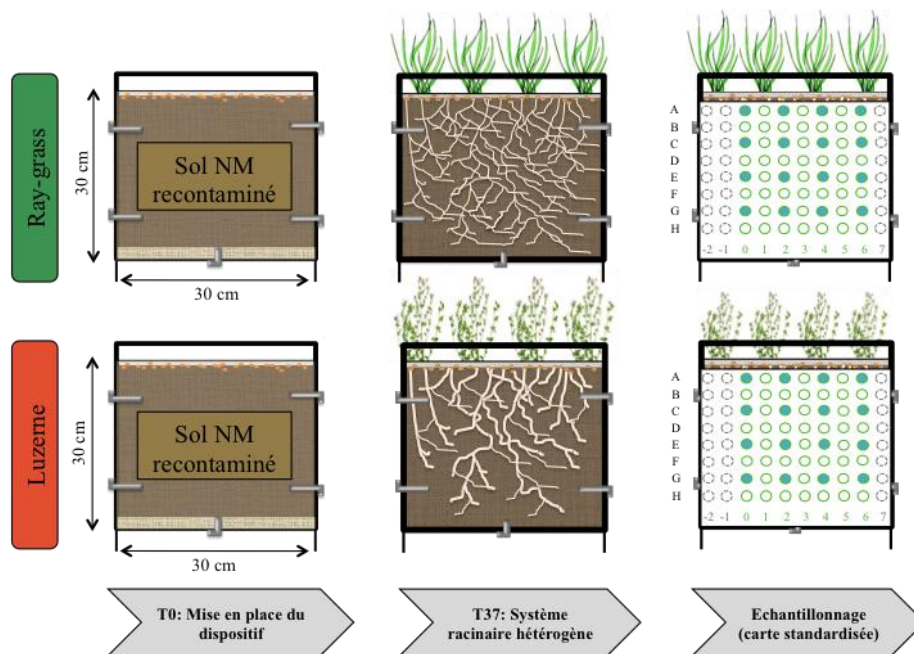


Figure 2.2. Schéma de l'expérience en rhizotron N°1. Dans deux rhizotrons différents, du ray-grass et de la luzerne ont été cultivés sur de la terre de NM recontaminée. Après 37 jours de croissance en chambre phytotronique, les deux rhizotrons ont été échantillonnés selon une carte de prélèvement regroupant 56 échantillons (en vert) dont 7 réplicats par profondeur numérotés de 0 à 6 et 8 profondeurs nommées de A à H. Des mesures d'humidité ont été réalisées sur 24 échantillons (en gris). Des mesures de concentration en carbone organique dissous, sucres, pH et en HAP biodisponibles ont été réalisées sur 16 échantillons par dispositif (en bleu).

2.2.4 Microcosmes utilisés pour l'étude de la variabilité temporelle

2.2.4.1 Dispositif

Les rhizotrons utilisés au cours de cette expérimentation se décomposent en deux parties distinctes : un premier compartiment (mini-rhizotron) en PMMA (p 7 x L 29,8 x l 2,3 cm), fermé au fond par de la toile à bluter (maille 5 μm) s'emboitant dans un deuxième compartiment que constitue le rhizotron précédemment décrit au §1.2.2.1 (**Figure 2.3**). Huit mini-rhizotrons ont été remplis de terre NM puis ajustés à 80% de la CRE de la terre (63 ml d'eau pour 320 g de terre), et 4 d'entre eux ont été plantés avec de la luzerne (*Medicago sativa* var. Europe) en semant 2,43 g de graines correspondant environ à 26 graines par cm^2 . Après germination les huit mini-rhizotrons (4 plantés et 4 non-plantés) ont été placés dans la chambre phytotronique pendant 15 jours, selon les conditions de culture précédemment décrites (**cf §1.2.2.1**), jusqu'à l'obtention d'un tapis racinaire au fond du dispositif. Après avoir découpé la toile à bluter au fond des 8 mini-rhizotrons, ces derniers ont été placés sur les 8 rhizotrons correspondants, préalablement remplis de terre NM recontaminée et humidifiée (selon la même procédure que décrite pour la préparation de l'expérimentation en rhizotron N°1), afin de permettre la pénétration du système racinaire dans la terre. L'assemblage des 2 compartiments constitue le temps initial de l'expérimentation (T0). Les 8 dispositifs ont été placés pendant 22 jours en chambre phytotronique selon les conditions contrôlées précédemment décrites, maintenus à 80% de la CRE par arrosage régulier comme dans l'expérience précédente (**cf §1.2.2.1**). Les dispositifs ont été déplacés tous les 2 jours dans la chambre phytotronique afin de limiter les biais dus à l'éclairage.

2.2.4.2 Echantillonnage

Au cours des 22 jours d'incubation, deux dispositifs (un planté et un non-planté) ont été sacrifiés pour réaliser des prélèvements à 4 temps différents, après respectivement 6 (T1), 12 (T2), 16 (T3) et 22 (T4) jours de culture. Une carte d'échantillonnage unique a permis de prélever 18 échantillons (6 échantillons distants de 3 cm pour chaque profondeur et à 3 profondeurs différentes A, B, C correspondant respectivement à 3, 9 et 15 cm par rapport à l'interface entre les deux compartiments) par dispositif (**Figure 2.3**). Des échantillons de terre (1,6 cm de diamètre et 2,5 cm de long) ont été prélevés grâce à un carotteur en acier inoxydable équipé d'un piston en téflon. Après avoir récupéré le sol rhizosphérique par trois lavages dans 3 ml d'eau distillée stérile, les racines de chaque échantillon ont été photographiées afin d'estimer la longueur racinaire grâce à une analyse d'image (logiciel ImageJ), puis elles ont été séchées à 60°C pendant 48 heures. Après avoir pesé la quantité de

sol rhizosphérique de chaque échantillon, permettant de calculer des ratios de sol rhizosphérique par rapport au sol total, les deux fractions de terre ont été mélangées afin d'obtenir un échantillon global. Des aliquots de terre fraîche ont été réalisés sur les 48 échantillons prélevés à la profondeur A (3 cm) afin d'extraire les HAP biodisponibles. Sur la totalité des échantillons (144) conservés à -80°C , des dosages de HAP totaux, des extractions d'ADNg et d'ARN ont été menés ultérieurement. Trois prélèvements par hauteur ont été également réalisés afin d'évaluer le gradient d'humidité au sein des dispositifs. Après récolte de la totalité des échantillons, quatre échantillons supplémentaires par hauteur ont été prélevés sur le sol restant afin de mesurer l'évolution de la concentration en carbone organique dissous (COD), en acides organiques et en sucres au cours du temps. Dans un premier temps, les analyses ont été menées exclusivement sur les échantillons à la profondeur A pour tous les temps (T0, T1, T2, T3, et T4), et les échantillons prélevés aux 3 profondeurs (A, B et C) après 22 jours (T4). Les différentes mesures ont également été menées sur les 8 (un lot par rhizotron) lots de terre recontaminée (T0), ayant permis de remplir les rhizotrons plantés et non-plantés, et en triplicat.

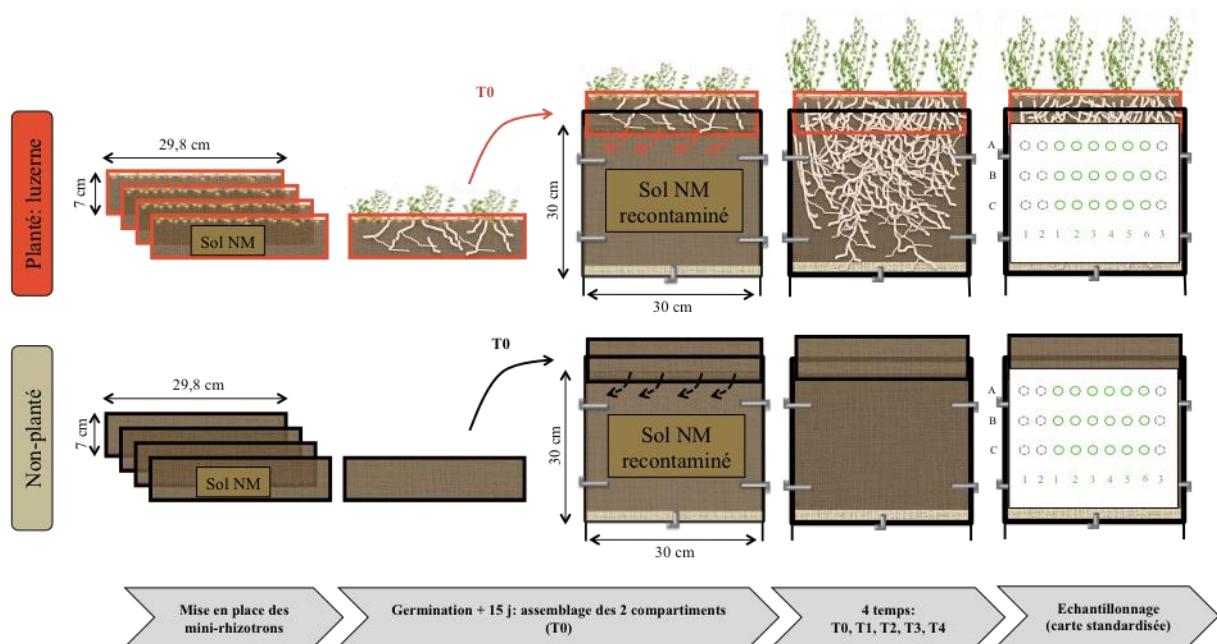


Figure 2.3. Schéma du dispositif expérimental N°2. Échantillonnage au cours du temps (T0, T1 (+6j), T2 (+12j), T3 (+16j), T4 (+22j), de deux dispositifs (planté avec de la luzerne et non planté), selon une carte de prélèvement standardisée regroupant 18 échantillons en vert (6 réplicats numérotés de 1 à 6 prélevés à 3 profondeurs (A: 3 cm, B: 9 cm, C: 15 cm). Des mesures d'humidité et de pH ont été réalisées sur 9 échantillons (en gris) et 4 prélèvements par hauteur ont été réalisés entre échantillons pour mesurer la teneur en COD, en acides organiques et en sucres.

2.3 Analyses

2.3.1 Caractérisation de la contamination en HAP

La contamination en HAP a été mesurée dans la terre échantillonnée, au cours des 3 études menées, afin de suivre la dissipation du polluant au cours du temps selon la présence de plante, de son espèce et de la variabilité dans l'espace au sein de la rhizosphère. Les expérimentations étant menées à partir de terre, il est important de considérer la réactivité des HAP dans cette matrice et d'étudier non seulement les HAP totaux, obtenus par une méthode d'extraction au solvant, mais aussi les HAP biodisponibles qui représentent la fraction accessible et potentiellement minéralisable.

2.3.1.1 Extraction des HAP totaux

Les HAP totaux ont été extraits à partir de 0,250 g de terre lyophilisée et broyée manuellement (étude en rhizotron N°1) ou à la pulvérisette (étude en rhizotron N°2) (Retsch MM200), mélangée avec 125 mg de terre de diatomée (Sigma-Aldrich) dans des cellules SST inox de 10 ml remplies de billes de verre (3 mm de diamètre), par extraction accélérée au dichlorométhane (ASE350 Dionex ®) selon le programme suivant : 2 cycles, 130°C, 100 bars, chauffage 7 minutes puis 5 minutes, purge de 60 secondes, rinçage à 60% du volume de la cellule. L'extrait a ensuite été évaporé sous flux d'azote puis repris dans un volume de 20 ml d'acétonitrile (solvant approprié pour le dosage) et conservé à 4°C. Pour l'analyse, 1 ml d'extrait a été filtré à 0,45 µm (PTFE, VWR™).

2.3.1.2 Extraction des HAP biodisponibles

Les HAP biodisponibles ont été extraits à partir de 1 g de terre fraîche et 20 ml d'une solution aqueuse d'hydroxypropyl-β-cyclodextrin filtrée à 0,22 µm (50 mM) (Acros organics, New Jersey, USA) dans des tubes de centrifugation PTFE Oak Ridge (FEP, Nalgene, USA) d'après la méthode décrite par Reid et al. (2000). Après 16 heures d'agitation orbitale (100 rpm) à 24°C (ELMI RM-2L, Intelli-Mixer) et deux étapes de centrifugation de 20 minutes à 10.000 rpm (Beckman, Avanti J-25), une extraction liquide: liquide au dichlorométhane (3 ajouts de 8 ml) des HAP a été réalisée dans une ampoule à décanter à partir du surnageant aqueux (40 ml). L'extrait a été évaporé sous flux d'azote puis repris dans 5 ml d'acétonitrile et conservé à 4°C. Pour l'analyse, 1 ml d'extrait a été filtré à 0,45 µm (PTFE, VWR™).

2.3.1.3 Dosage des HAP

Les HAP ont été dosés par HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography, Dionex Ultimate 3000 System) en injectant 10 µl d'extrait. La colonne de séparation des molécules, chauffée à 30°C mesure 100 mm de long, 4,6 mm de diamètre interne, présente une granulométrie de 2,6 µm (Supelco Ascendis Express C10) et une phase mobile constituée à 100% d'acétonitrile. Dans les fractions totales, un détecteur à fluorescence a été utilisé afin de quantifier 15 HAP (excluant l'acénaphthylène) présent en plus faible concentration dans la fraction biodisponible. Dans l'expérience en rhizotron N°2 (*Chapitre 5*), l'analyse des HAP a été réalisée sur 13 HAP, en excluant le naphthalène, l'acénaphthylène et l'acénaphthène estimés trop volatiles pour être quantifiés de façon répétable dans les échantillons au cours de la cinétique.

Par ailleurs au cours de cette expérimentation, les composés aromatiques polycycliques polaires (pPAC) ont été dosés à partir des extraits aux dichlorométhane par GC-MS (gas chromatography coupled to mass spectrometry). Un appareil GC-6890 (Agilent), équipé d'une colonne DB5-MS (60 × 0.25 mm id × 0.1 µm d'épaisseur), couplé à un MS-5973 Inert (Agilent), en mode SIM (Single Ion Monitoring) a été utilisé. Le programme de température du four était le suivant: 2 minutes à 70 °C, puis de 70 °C à 130 °C à 15 °C min⁻¹, puis de 130 °C à 315 °C à 4 °C min⁻¹ puis un maintien pendant 25 min à 315 °C. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur, à un flux constant de 1.4 ml min⁻¹. Les 15 pPAC, 11 pPAC oxygénés (O-PACs) et 4 pPAC azotés (N-PACs), ont été quantifiés grâce à un standard interne deutéré comme décrit par Hanser (2015).

2.3.2 Analyse des paramètres de la rhizosphère : pH, teneurs en sucres, en acides organiques et en carbone organique dissous

Le principal impact du développement des végétaux dans le sol est la libération de source de carbone via les exsudats racinaires, c'est pourquoi les teneurs en sucres, en acides organiques et en carbone organique dissous ont été quantifiées. Ces exsudats peuvent aussi acidifier la terre, ainsi le pH a également été mesuré en parallèle. Ces paramètres permettent de caractériser la variabilité spatiale et temporelle au sein de la rhizosphère des 2 plantes étudiées.

2.3.2.1 Mesures de pH

Une suspension de 1 g de terre (humide, stockée à -80°C) et 5 ml d'eau ultra pure a été réalisée dans des tubes de centrifugation PTFE Oak Ridge (FEP, Nalgene, USA). Après 2

heures d'agitation orbitales à 80 rpm (Stuart, rotator SB3), le pH_{eau} a été mesuré (BioBlock scientific, pHM210 Radiometer analytical) dans le surnageant.

2.3.2.2 Analyse des teneurs en sucres, acides organiques et carbone organique dissous

Ces analyses ont été réalisées à partir de la suspension réalisée ci-dessus, après une étape de centrifugation de 10 minutes à 4.000 rpm et 20°C (Beckman, Avanti J-25), et filtration à 0,45 µm (Polyester, Chromafil PET-45/25 Macheney Nagel) du surnageant. L'échantillon a été analysé pur afin de quantifier les teneurs en sucres et en acides organiques et dilué au 1/20^{ème} afin de mesurer la teneur en carbone organique dissous.

Le carbone organique dissous a été dosé à partir de 50 µl d'extrait en utilisant un analyseur de carbone (TOC-V CSH, Shimadzu), par oxydation thermique à 680°C et une détection infrarouge du CO₂ à une longueur d'onde de 2200 cm⁻¹ après acidification à l'acide chlorhydrique pour éliminer les carbonates. La teneur en sucres a été mesurée à partir de 20 µl d'extrait, par chromatographie ionique (ICS 5000) équipée d'une colonne CarboPac SA10 (Thermo Electron, Dionex) à 40°C à la Plateforme technique d'écologie fonctionnelle (PTEFOC81) des UMR1137 EEF et UR1138 BEF du Centre de Recherche INRA Nancy-Lorraine (Champenoux). Les acides organiques ont été quantifiés à partir de 25 µl d'extrait, par chromatographie ionique (ICS 3000) équipée d'une colonne AS 11-HC (Thermo Electron, Dionex) à 35°C.

2.3.3 Caractérisation des communautés microbiennes totales et actives

Bien que les méthodes culturales permettent d'isoler et de caractériser les microorganismes endogènes d'un sol, seulement 1% d'entre eux sont cultivables ce qui limite leur étude. L'utilisation d'approches de biologie moléculaire, à partir de l'ADN génomique extrait du sol, permet d'obtenir une vision plus exhaustive de la communauté microbienne d'un environnement. L'utilisation de différentes techniques décrites ci-dessous a permis de caractériser la variabilité spatiale et temporelle dans la rhizosphère des communautés microbiennes, en termes d'abondance (PCR quantitative en temps réel) mais aussi de diversité et de structure (Pyroséquençage-454, Roche). Par ailleurs, la variabilité des communautés fonctionnelles, potentiellement impliquées dans la biodégradation des HAP, a été étudiée en ciblant des gènes de fonctions (HAP-dioxygénase). Enfin, la diversité des communautés actives a été déterminée en parallèle, *via* des extractions de l'ARN total du sol, convertit en ADN complémentaire, sur lequel les mêmes analyses que précédemment ont été menées.

2.3.3.1 Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique total a été extrait à partir de 0,5 g de terre (humide, stockée à -80°C) en utilisant le kit FastDNA SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, France), selon le protocole fourni. Brièvement après une étape de lyse cellulaire mécanique et de précipitation des protéines, l'ADNg a été fixé sur une matrice de silice, purifié sur colonne par 500 µl d'une solution de lavage puis élué dans 100 µl d'eau Dnase-free. La concentration et l'absorbance des extraits à 260 et 280 nm ont été mesurées à partir de 3 µl, au spectrophotomètre (UV1800, Shimadzu), à l'aide d'un module Tray cell (Hellma). La pureté des acides nucléiques a été estimée en calculant le ratio A_{260}/A_{280} (révélateur de la contamination en protéines) qui doit être compris entre 1,8 et 2 pour être acceptable. Les extraits ont été dilués au $1/10^{\text{ème}}$ afin de réaliser les amplifications par PCR. Les échantillons d'ADNg, préparés au cours des expérimentations en rhizotron N°2, ont été quantifiés après une dilution au $1/40^{\text{ème}}$ en utilisant le kit Quant-iT PicoGreen asDNA Assay kit (Invitrogen) grâce à une gamme étalon allant de 0,03125 à 2 ng d'ADN/µl, à 480 nm au lecteur de microplaques Xenius (SAFAS, Monaco). Ces extraits ont ensuite été dilués à 2 ng/µl avant amplifications.

2.3.3.2 Extraction d'ARN

Au cours de l'expérimentation en rhizotron N°2, des extractions d'ARN totaux ont été réalisées à partir du même aliquot de 0,5 g de sol (humide, stocké à -80°C) utilisé pour extraire les ADNg. Après avoir fixé l'ADNg à la matrice de silice, les ARN totaux ont été précipités par 100 µl d'acétate de sodium (0,1 Volume, 3M, pH 5,2) et 1 ml d'isopropanol (1 nuit à 4°C) à partir des lixiviats obtenus. Après avoir resuspendu les extraits dans 45 µl d'eau Rnase-free (MP Biomedicals, France), deux traitements DNase successifs ont été réalisés avec entre chacun une étape de purification des ARN en utilisant le kit RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen) selon le protocole fourni. Brièvement, 10 µl de tampon DNase Mg^{2+} (10x) et 1 µl d'enzyme DNase (1 unité/µl) ont été ajoutés à chaque extrait. Le mélange réactionnel a été incubé 1 heure à 37°C, puis l'utilisation de colonne et d'étape de nettoyage ont permis d'éluer 30 µl d'extrait pure. Puis les extraits ont été quantifiés après une dilution au $1/40^{\text{ème}}$, en utilisant le kit Quant-iT RicoGreen RNA Assay kit (Invitrogen), grâce à une gamme étalon allant de 0,03125 à 2 ng d'ARN /µl à 480 nm au lecteur de microplaques Xenius (SAFAS, Monaco), afin de convertir en ADN complémentaire (ADNc) une quantité d'ARN identique pour chaque échantillon, correspondant à 22,272 ng d'ARN. Le mélange réactionnel de 20 µl, permettant la reverse transcription (SuperScript III First-Strand, Invitrogen), contenait 1 µl d'hexamère aléatoire (50 ng/ µl), 1 µl de tampon d'hybridation et

22,272 ng d'ARN pure, qui ont été placés 5 min à 65°C et 1 min sur glace. Puis 10 µl de tampon de réaction (2x) et 2 µl de mix enzyme ont été ajoutés au mélange et placés 10 min à 25°C, 50 min à 50°C et 5 min à 85°C.

2.3.3.3 *PCR quantitative en temps réel*

L'abondance des communautés fongiques, bactériennes et celle des bactéries dégradant les HAP, a été mesurée par PCR quantitative en temps réel selon les conditions détaillées dans le **Tableau 2.4** et décrites par Cébron et al. (2008); Thion et al. (2013). Le mélange réactionnel de 20 µl, contenait 10 µl de mix iQ SYBR green SuperMix (Bio-Rad), 0,8 µl de chaque amorce (10 µM), 0,4 µl de BSA 3% (sérum albumine bovine), 0,2 µl de DMSO (diméthylsulfoxyde), 0,08 µl de protéine gp32 du bactériophage T4 (MP Biomédicals, France) et 1 µl d'ADNg dilué ou d'ADNc pur. L'amplification et la quantification ont été réalisées en utilisant le thermocycler CFX96 (Bio-Rad) associé à un logiciel de traitement (Bio-Rad CFX Manager, version 2.0) et une gamme de dilution de standard allant de 10^8 à 10^1 copies de gènes par µl. Un facteur de correction, prenant en compte l'humidité de la terre, a été appliqué afin d'exprimer les résultats en nombre de copie de gène par gramme de terre sèche. L'abondance des communautés fongiques et des communautés bactériennes dégradant les HAP a été exprimée en pourcentage par rapport à l'abondance de la communauté bactérienne totale.

Tableau 2.4. Caractéristiques des programmes et des amorces utilisées dans le cadre des PCR quantitatives en temps réel.

Communautés	Gènes	Amorces	Séquences (5'-3')	Programmes	Références
Bactérienne	ADNr 16S	1401R 968F	CGG TGT GTA CAA GAC CC AAC GCG AAG AAC CTT AC	95°C, 5min (1 cycle) 95°C, 20 s ; 56°C, 20 s ; 72°C, 30 s ; 82°C, 5 s (39 cycles) 72°C, 5 min ; 95°C, 30 s ; 51°C, 5 s ; 95°C, 0,5 C	Felske <i>et al.</i> 1998 Cébron <i>et al.</i> 2008
Fongique	ADNr 18S	FF390R Fung5F	GAG GTC TCG TTC GTT ATC G GGG AAC CAG GAC TTT TAC	95°C, 5min (1 cycle) 95°C, 20 s ; 50°C, 20 s ; 72°C, 30 s ; 80°C, 10 s (44 cycles) 72°C, 5 min ; 95°C, 10 s ; 65°C, 5 s ; 95°C, 0,5 C	Lueders <i>et al.</i> 2004 Thion <i>et al.</i> 2013
HAP dégradante à Gram positif <i>Actinobacteria</i>	PAH-RHD _a GP	PAH-RHD _a GP 1R PAH-RHD _a GP 1F	GGG GAA CAC GGT GCC RTG DAT RAA CGG CGC CGA CAA YTT YGT NGG	95°C, 3min (1 cycle) 95°C, 20 s ; 54°C, 20 s ; 72°C, 20 s ; 82°C, 5 s (44 cycles) 72°C, 5 min ; 95°C, 30 s ; 54°C, 5 s ; 95°C, 0,5 C	Cébron <i>et al.</i> 2008
HAP dégradante à Gram négatif <i>Proteobacteria</i>	PAH-RHD _a GN	PAH-RHD _a GN 3R PAH-RHD _a GN 3F	AGC TGT TGT TCG GGA AGA YWG TGC MGT T GAG ATG CAT ACC ACG TKG GTT GGA	95°C, 3min (1 cycle) 95°C, 20 s ; 57°C, 20 s ; 72°C, 20 s ; 82°C, 5 s (44 cycles) 72°C, 5 min ; 95°C, 30 s ; 54°C, 5 s ; 95°C, 0,5 C	Cébron <i>et al.</i> 2008

2.3.3.4 Séquençage haut débit : étude de la diversité

2.3.3.4.1 PCR

Les régions V4-V5 de l'ADNr 16S (392 pb) bactérien et ITS1 fongique (400 pb) ont été amplifiées par PCR à partir de l'ADNg selon les conditions décrites dans le **Tableau 2.5**, afin d'étudier respectivement la diversité bactérienne et fongique

Tableau 2.5. Caractéristiques des programmes et des amorces utilisées dans le cadre des PCR pour le pyroséquençage 454 Roche.

Diversité	Gènes	Amorces	Séquences (5'-3')	Programmes	Références
Bactérienne	ADNr 16S Région V4-V5	515F 907R	GTG CCA GCM GCC GCG GTA A CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT	94°C, 5min (1 cycle) 94°C, 30 s ; 55°C, 1 min ; 72°C, 1 min ; 72°C, 10 min (30 cycles)	Turner <i>et al.</i> 1999
Fongique	ITS1	ITS1F ITS2	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	94°C, 5min (1 cycle) 94°C, 30 s ; 50°C, 1 min ; 72°C, 1 min ; 72°C, 10 min (30 cycles)	Garde <i>et al.</i> 1993 White <i>et al.</i> 1990

Pour chaque échantillon les amplifications ont été réalisées en cinq réplicats indépendants, avec un couple d'amorces présentant à son extrémité 5' une séquence de 10 nucléotides spécifique de chaque échantillon, appelée MID (Multiplex Identifier, Roche), permettant d'identifier son appartenance à un échantillon. Le mélange réactionnel de 50 µl contenait 10 µl de mix PCR prêt à l'emploi Taq-&Go™ (MP Biomedicals), 1 µl de chaque amorce (10 pM) marquée d'un MID spécifique et 2 µl d'ADNg dilué au 1/10^{ème} avec de l'eau DNase,

RNase-free (MP Biomedicals, France). L'efficacité et la spécificité des PCR ont été vérifiées par migration (100 mV) par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans du TAE 1x (Euromedex), et observées après coloration au bromure d'éthidium sous UV au GelDoc XR (Bio-Rad). Les 5 produits PCR ont été poolés, purifiés avec le kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) puis quantifiés au spectrophotomètre (UV1800, Shimadzu) à l'aide d'un module Tray-cell (Hellma) afin de préparer des mélanges équimolaires de 50 µl à 40 ng d'ADN/µl d'amplicons 16S ou ITS, regroupant la série d'échantillons à analyser (**Figure 2.4**).

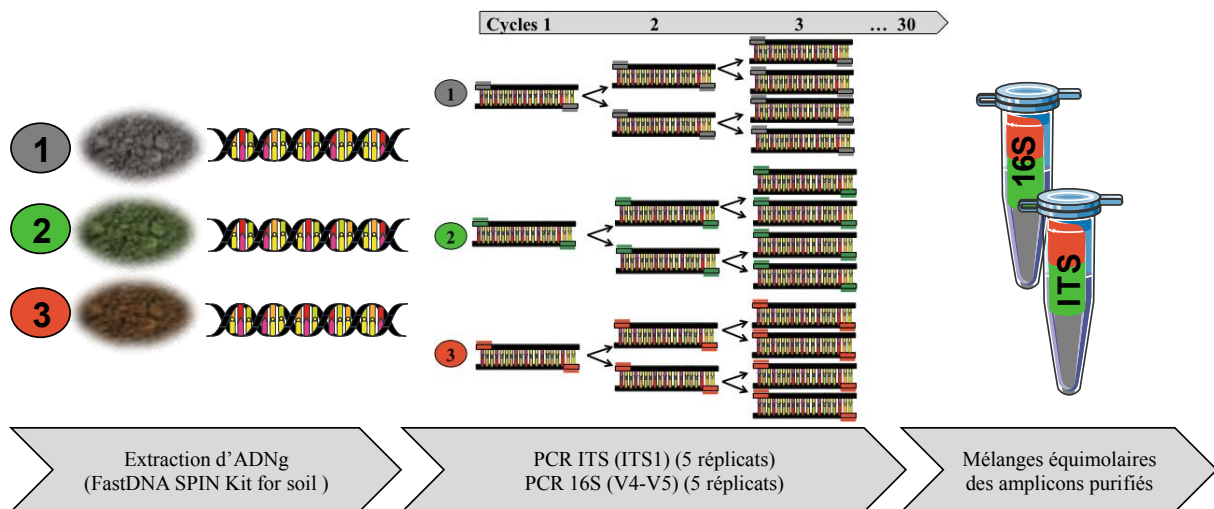


Figure 2.4. Préparation des échantillons en vue de la réalisation du pyroséquençage 454/Roche GS-FLX Titanium.

2.3.3.4.2 Pyroséquençage 454

Le pyroséquençage a été réalisé par Beckman Coulter Genomics (Danvers, USA) en utilisant la technologie 454/Roche GS-FLX Titanium décrite dans la **Figure 2.5**. Tout d'abord, 2 bibliothèques d'ADN simple brin ont été construites à partir des mélanges équimolaires d'amplicons 16S et ITS, en liant deux adaptateurs (A et B) à chacune des deux extrémités des fragments. Puis une PCR en émulsion a été réalisée après avoir fixé chaque simple brin d'ADN sur une bille indépendante (A) *via* les adaptateurs, permettant d'amplifier un unique fragment par bille. Le pyroséquençage, réalisé après avoir réparti chaque bille dans un puits d'une plaque PTP (Pico Titer Plate), consiste en la succession de 3 réactions enzymatiques, permettant la capture d'un signal lumineux après incorporation de chaque nucléotide, ajouté de manière séquentielle, complémentaire du simple brin fixé à la bille, et permettant l'obtention d'un pyrogramme correspondant à la séquence nucléotidique.

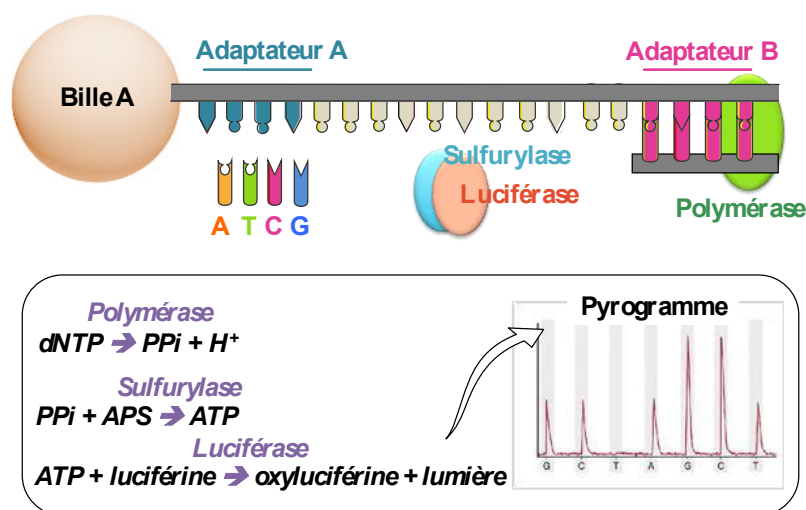


Figure 2.5. Technologie du pyroséquençage 454 Roche (d'après <http://454.com/index.asp>).

2.4 Analyse des données

2.4.1 Analyses bioinformatiques

Au cours de mes travaux de thèse, deux approches (**Figure 2.6**) faisant appel à des outils bioinformatiques différents ont été utilisées afin d'étudier les données générées suite au pyroséquençage. L'étude *in situ* de l'évolution des communautés bactériennes et fongiques au cours du temps, en présence ou non de plante (**Chapitre 6**), a été réalisée en utilisant le module *pyrosequencing pipeline* du Ribosomal Data Project (RDP) et Mothur (version 1.29.2) selon la démarche décrite par Sogin et al. (2006), tandis que l'étude de la variabilité spatiale et temporelle de la diversité bactérienne en rhizotron (**Chapitre 4**) a été étudiée par Qiime (version 1.8.0) (Caporaso et al. 2010) d'après les scripts disponibles en ligne (<http://qiime.org/index.html>). Les fonctions utilisées pour les étapes principales sont précisées comme suit (> fonction).

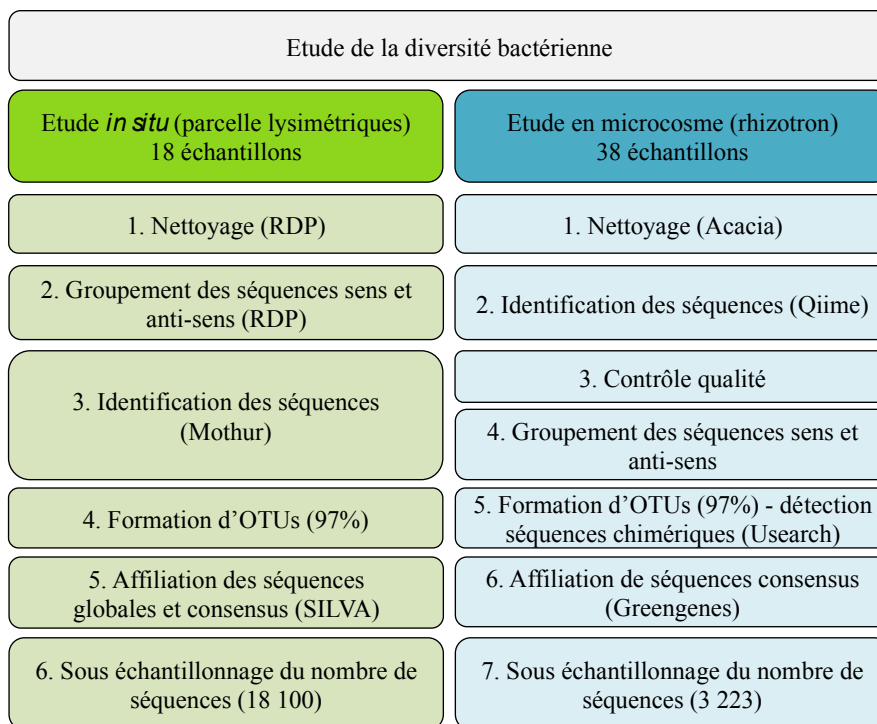


Figure 2.6. Synthèse des principales étapes de traitement des données brutes de pyroséquençage 454 selon les deux approches adoptées au cours des expérimentations *in situ* et en microcosmes.

2.4.1.1 Pour l'étude *in situ* de la diversité microbienne

2.4.1.1.1 Diversité bactérienne

A partir des données brutes (fichier .sff), regroupant 545 631 séquences d'ADNr 16S, le pipeline de pyroséquençage du RDP (pipeline initial process) a été utilisé afin de filtrer les séquences selon la présence des deux amorces, des critères de taille (longueur minimal de 300 pb) et de qualité (un score de qualité moyen au minimum de 20, l'absence de bases non identifiées). Cette première étape a été réalisée sur les séquences sens (5'-3') et non-sens (3'-5'), ces dernières ayant été reverse-complémentées et groupées aux séquences sens dans un seul et même fichier afin de poursuivre l'analyse sur la globalité des séquences. Suite à ces étapes, un total de 482 163 séquences a été obtenu. Après avoir attribué à chaque séquence son échantillon de provenance, d'après leur MID, les séquences ont ensuite été alignées dans Mothur (version 1.29.2) (>align.seqs ; >dist.seqs). L'assignement taxonomique a été réalisé en utilisant la base de données SILVA à partir de la totalité des séquences mais également à partir d'une séquence consensus représentative de chaque OTU (unité taxonomique opérationnelle) formée à 97% de similarité (>cluster ; >make.shared). Le nombre de séquences par échantillon étant hétérogène, une étape de sous échantillonnage au nombre

minimal de séquences (18 100 séquences) a été réalisée afin de pouvoir comparer les différentes conditions étudiées (>sub.sample). Ainsi l'analyse de la diversité bactérienne a été réalisée sur un total de 325 800 séquences regroupées en 40 835 OTUs.

2.4.1.1.2 Diversité fongique

L'utilisation d'un pipeline utilisant Mothur, développée au sein de l'UMR 1136 IAM du Centre de Recherche INRA Nancy-Lorraine (Coince et al. 2013) a permis d'obtenir 360 477 séquences ITS de qualité après filtration des données brutes (438 492 séquences). Les séquences ont ensuite été réattribuées à leur échantillon d'origine et filtrées selon des paramètres par défaut (qwindowsize=50, qstepsize= 1, bdiffs, pdiffs, ldiffs, sdiffs et tdiffs=0) dans Mothur (version 1.20.1) (Schloss et al. 2009). La région ITS1 a été extraite en utilisant un logiciel d'extraction d'ITS fongique (version 2) (Nilsson et al. 2010), puis les séquences ont été filtrées selon la taille de 100 pb. Après standardisation du nombre de séquences entre les échantillons à 9100, les séquences consensus, générées par Uclust (version 3.0) à partir des OTU formées à 97% de similarité, ont été assignées taxonomiquement en utilisant la base de données UNITE et l'algorithme Blastn (version 2.2.2.3) (Altschul et al. 1990). L'assignement de la totalité des séquences a également été réalisé. L'analyse de la diversité fongique a été menée sur un total de 163 800 séquences, regroupées en 8 079 OTUs.

2.4.1.2 Pour l'étude en microcosmes de la diversité bactérienne

A partir des données brutes (fichiers .fasta et .qual) fournies par Beckman Coulter Genomics regroupant 573 379 séquences, une première étape d'élimination du bruit de fond (erreur due aux homopolymères), appelée « denoising », a été réalisée en utilisant Acacia (version 1.52-b0) afin de filtrer les séquences selon des critères de qualité et de taille par défaut (max average quality : 20, max. no. of SD's from mean length : 2, Maximum k-mer dist between reads : 13, Error model to use : Balzer, statistical significance threshold : 9) (Bragg et al. 2012). Dans Qiime, l'ensemble des séquences conservées (565 240) a pu être réattribué à son échantillon d'origine grâce aux MID (>split_libraries.py). Un nouveau filtre de qualité a été réalisé selon les critères suivants : une taille de séquence comprise entre 300 et 500 pb, un score de qualité moyen au minimum de 25, l'absence de bases non identifiées et une longueur maximale d'homopolymère de 6 pb. A l'issue, 436 550 séquences ont été conservées. Après avoir « reverse-complémenté » les séquences non-sens (3'-5') (>adjust_seq_orientation.py), les séquences des amorces et des MID ont été extraites et le programme Usearch a été utilisé afin de regrouper les séquences présentant une similarité supérieure ou égale à 97% en OTUs

(>pick_otus.py). La détection des séquences chimériques, pouvant résulter de l'assemblage de deux séquences d'ADNr 16S lors de l'amplification par PCR, a été effectuée lors de cette étape avec Uchiime (Edgar 2010). Puis une séquence consensus de chaque OTU, identifiée comme étant la plus abondante (>pick_rep_set.py), a été affiliée taxonomiquement en utilisant l'algorithme du RDP classifier (Wang et al. 2007) et la base de données de Greengenes 13_5 (>assign_taxonomy.py) (McDonald et al. 2012). Après standardisation du nombre de séquence (3223 séquences), les données analysées regroupaient 122 474 séquences et 3327 OTUs après traitement (>single_rarefaction.py).

2.4.1.3 Analyse de la diversité

2.4.1.3.1 Courbe de raréfaction

Des courbes de raréfaction de la diversité (Pearson and Rosenberg 1978), représentant le nombre cumulé d'OTUs en fonction du nombre de séquences, ont été tracées pour les deux études en microcosmes et *in situ* (**Chapitres 4 & 6**) en utilisant respectivement les programmes Analytic Rarefaction (Logiciel Hunt Mountain) et Qiime (version 1.8.0) (>alpha_rarefaction.py). Les courbes de raréfaction ont permis de réaliser une première comparaison visuelle de la diversité entre les différentes conditions testées et de déterminer si un plateau a été atteint pour chacune, correspondant à une bonne estimation de la diversité.

2.4.1.3.2 Alpha diversité

Des indices de diversité, d'estimation de la richesse (Chao1 et nombre d'OTUs) et d'équitabilité ont été calculés par EstimateS (**Chapitre 6**) et Qiime (**Chapitre 4**) (**Tableau 2.6**). Deux indices de diversité, Simpson et Shannon-Weaver, respectivement plus sensibles aux variations des espèces abondantes et rares, ont été calculés. L'indice de Shannon, prenant en compte le nombre d'espèces et l'abondance des individus dans chaque espèce, varie entre 0 (signifiant une communauté dominée par une seule espèce) et $\ln S$ (avec S : le nombre d'espèce) (où toutes les espèces présentes ont une abondance similaire). La diversité a également été estimée en calculant l'indice de Simpson, qui représente la probabilité que 2 individus pris au hasard appartiennent à la même espèce, et qui varie entre 0 et 1 (avec 1 représentant une diversité minimum). Cet indice étant inversement proportionnel à la diversité, une autre formulation plus intuitive est couramment utilisée. Au cours de ces travaux l'inverse de cet indice ($1/D$) a été calculé avec une diversité plus importante lorsque $1/D$ tend vers l'infini. L'indice d'équitabilité de Shannon, permettant d'évaluer la répartition des individus au sein des différentes espèces, varie entre 0 et 1, exprimant respectivement

pour ces valeurs la dominance d'une espèce et une répartition homogène de la communauté au sein de plusieurs espèces.

Tableau 2.6. Synthèse des différents indices de diversité, richesse et d'équitabilité calculés afin de caractériser les communautés microbiennes.

Indices	Indices de Diversité		Indice de richesse	Equitabilité
	Shannon-Weaver (H')	Simpson (D)	Chao1	Equitabilité de Shannon (E _H)
Expression mathématique	$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$ <p>i : une espèce p_i : proportion d'une espèce S : nombre total d'espèces</p>	$D = \sum \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$ <p>n_i : nombre d'individus dans l'espèce i N : nombre total d'individus</p>	$S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{n_1^2}{2n_2}$ <p>S_{obs} : nombre d'espèces observées n₁ : nombre de singleton n₂ : nombre de doubleton</p>	$E_H = \frac{H}{H_{max}}$ <p>H : indice de Shannon</p>
Bornes de valeurs	Entre 0 et lnS	Entre 0 et 1	0 à ∞	Entre 0 et 1
Interprétation	Nombre d'espèces différentes, en prenant en compte leurs abondances		Nombre d'espèces différentes dans la communauté	Régularité du nombre d'individu par espèce
Références	Shannon and Weaver 1963	Simpson 1949	Chao 1984	Pielou 1966

2.4.1.3.3 Beta-diversité

La bêta-diversité est définie comme la diversité propre à chaque communauté microbienne, pouvant expliquer les différences observées entre deux conditions. Tout d'abord, l'abondance relative des groupes taxonomiques dominants (au moins 3 séquences), à différents niveaux d'affiliation allant du phylum à l'ordre, a été comparée. Concernant l'étude *in situ* (**Chapitre 6**), une analyse plus approfondie a été réalisée après sélection de la communauté microbienne dominante (≥ 2%), au niveau de l'OTU. Lors de l'étude en rhizotron N°1 (**Chapitre 4**), un diagramme de Venn au niveau OTU a été construit dans Qiime (1.0.8) afin de visualiser les communautés bactériennes spécifiques et partagées entre les différentes conditions étudiées (T0, T37 ray-grass et T37 luzerne). L'indice de similitude de Sorensen ($\beta = \frac{2c}{S_1+S_2}$), avec S₁ et S₂ : le nombre d'espèce total des communautés 1 et 2 respectivement et c : le nombre d'espèces communes entre les deux communautés, a été également calculé considérant un partage d'espèce commune plus important lorsque β tend vers 1.

2.4.2 Analyses statistiques

L'analyse des différences statistiques ($p < 0,05$) a été effectuée en utilisant le logiciel XLStat 2013 (version 2.01, Addinsoft). Des tests t de Student ont été utilisés lors de la comparaison de deux conditions (planté/non planté, T0/T37, luzerne/ray-grass) et des ANOVA (ANalysis Of VAriance) à 1 ou 2 facteurs pour la comparaison de plus de deux conditions (effet temps/profondeur, effet temps/plantes), suivi de tests de comparaison multiple de Newman-Keuls. Pour l'expérimentation en rhizotron N°2 (**Chapitre 5**), des ANOVA à 2 facteurs (condition/temps) ont été utilisées pour étudier l'effet de la présence de plantes entre T1 et T4, et des ANOVA à 1 facteur ont été utilisées indépendamment dans chacune des deux conditions (planté/non planté) pour étudier l'effet du temps entre T0 et T4. Des tests de Fisher ont été réalisés afin d'étudier l'homogénéité des variances entre deux conditions (**Chapitre 3**). Concernant l'analyse de la composition des communautés bactériennes, lors de l'étude en rhizotron N°1 (**Chapitre 4**), les différences statistiques (correction de Benjamini-Hochberg de p pour des jeux de données consécutifs : $q < 0,05$) ont été étudiées en utilisant le logiciel STAMP (version 2.0.8) (Parks and Beiko 2010) permettant de calculer un « effect size (ES) » qui évalue quantitativement l'importance de l'effet statistique (Nakagawa and Cuthill 2007). Des tests t de Welch ont été réalisés pour la comparaison de deux conditions (T0/T37, luzerne/ray-grass) et des ANOVA suivis de tests de comparaison multiple de Tukey-Kramer ont été effectuées pour la comparaison des différentes profondeurs. Lors de la comparaison de deux conditions, préalablement identifiées comme significativement différentes, un effet statistique (ES) « important » a été défini pour un taxon lorsque la différence entre les abondances relatives de ce taxon dans les deux conditions testées était > 1 ou que le ratio entre les abondances relatives de ce taxon était > 4 . Lors de la comparaison de plus de deux conditions, un ES représenté par un $\eta^2 > 0,26$ (Nakagawa and Cuthill 2007) a été défini comme « important » pour un taxon.

Des analyses multi-variées ont été réalisées afin d'identifier des corrélations entre les paramètres biologiques, chimiques et physiques analysés au cours des trois études, en microcosme et *in situ* (**Chapitres 3, 4, 5 et 6**). Le logiciel XLStat-ADA 2015 (Addinsoft) a été utilisé afin de réaliser une analyse canonique des correspondances (CCA) suivie d'un test de Monte Carlo (1000 permutations) afin d'étudier l'impact des paramètres environnementaux significatifs (ANOVA) sur les communautés fongiques et bactériennes (au niveau de l'ordre) au cours du temps et selon la présence ou non de luzerne, lors de l'étude *in situ* (**Chapitre 6**). Une analyse ascendante hiérarchique (ACH) à deux dimensions a été réalisée à partir des

données normalisées (centrées-réduites) en utilisant le logiciel XLStat2011-Omics (Addinsoft), ce qui a permis de classer les OTUs et les échantillons selon leur dissimilarité (distance Euclidienne) et de générer deux dendrogrammes. Une heat map, représentant l'abondance relative des OTUs bactériennes et fongiques dominantes en fonction des 6 conditions étudiées (planté/ non-planté à 3 temps), a ainsi pu être tracée.

Pour la première étude en rhizotron (**Chapitre 3**), une analyse en composante principale de Pearson (ACP) a été réalisée après avoir normalisé (centré-réduit) et renommé par leurs coordonnées spatiales l'ensemble des données récoltées par l'analyse des deux dispositifs (XLStat 2013, Addinsoft). Le logiciel R (version 3.0.1) a été utilisé afin de réaliser une analyse en positionnement multidimensionnel non-métrique (nMDS) des données de diversité bactérienne au niveau OTU (T37 luzerne/T37 ray-grass) à partir d'une matrice de dissimilarité de Bray-Curtis. Puis la fonction `{envfit}` de Vegan/R (Oksanen et al. 2013) a permis de mettre en relation ces données avec les caractéristiques physico-chimiques significatives et covariantes (corrélation de Pearson) du sol.

2.4.3 Analyses géostatistiques

Au cours de l'expérimentation en rhizotron N°1 (**Chapitre 3**), la variabilité spatiale des paramètres mesurés dans la rhizosphère de la terre multi-contaminée NM, a été étudiée en utilisant une approche géostatistique en collaboration avec le Dr. Chantal de Fouquet (Centre de géostatistique, Ecole des mines de Paris, Fontainebleau). Cette méthode d'interpolation spatiale, permettant à partir de points mesurés d'estimer d'autres points non échantillonnés, correspond à un traitement statistique de données spatialisées afin d'en étudier la structure spatiale. Les géostatistiques prennent en compte la continuité spatiale de la variable étudiée entre les points de mesures afin de calculer le poids des points environnants les uns par rapport aux autres et de quantifier une erreur d'estimation (Chilès and Delfiner 2012). Ainsi cette approche permet de mettre en évidence si la distribution d'une variable est aléatoire ou spatialement auto-corrélée, signifiant que des échantillons spatialement proches sont davantage similaires que des échantillons éloignés. La réalisation d'une analyse variographique, suivie d'une modélisation des données et d'une estimation par krigeage, a permis de cartographier les différentes variables étudiées (Chilès and Delfiner 2012).

2.4.3.1 Analyse exploratoire et variographique

Une analyse exploratoire a tout d'abord été menée en traçant des nuages de corrélation par classe, représentant les différents paramètres étudiés en fonction de la profondeur ou de la biomasse racinaire. Puis deux coefficients de corrélation ont été calculés permettant de prendre en compte des relations linéaires (coefficient de corrélation de Spearman : $r(x, y) = \frac{E(x,y).E(x).E(y)}{\sigma_x.\sigma_y}$) ou non linéaires ($\eta_{y/x}^2 = \frac{V(esp(x:y))}{V(y)}$) entre les variables.

La structure spatiale des variables a été étudiée grâce à une analyse variographique, en utilisant le logiciel ISATIS (Geovariance). Le semi-variogramme expérimental, représentant la semi-variance $\gamma^*(\vec{h})$ (variance statistique de la différence entre deux points) en fonction de la distance de séparation entre les échantillons, a été calculé selon un pas de 3 cm $\gamma^*(\vec{h}) = \frac{1}{2.n(\vec{h})} \sum_{i=1}^{n(\vec{h})} (z(x_i + \vec{h}) - z(x_i))^2$ avec x correspondant aux point expérimentaux, z(x) à la variable et $n(\vec{h})$ au nombre de paires de points séparés par la distance \vec{h} . L'analyse du variogramme permet de mettre en évidence la variabilité spatiale des variables mesurées. Lorsque la variable est spatialement auto-corrélée, la semi-variance (la différence) est généralement faible à courte distance entre les échantillons, puis augmente avec la distance jusqu'à atteindre une certaine distance a (la portée) à partir de laquelle les échantillons sont considérés comme indépendants et les données de la variable ne sont plus corrélées, le variogramme atteint alors le plateau (palier : $C_0 + C$). L'effet pépité (C_0), qui correspond à la valeur de la semi-variance à l'origine, représente la variabilité des données à petite distance (**Figure 2.7**). Une fois le variogramme expérimental tracé, la variabilité spatiale des données est analysée en ajustant le variogramme à des modèles théoriques.

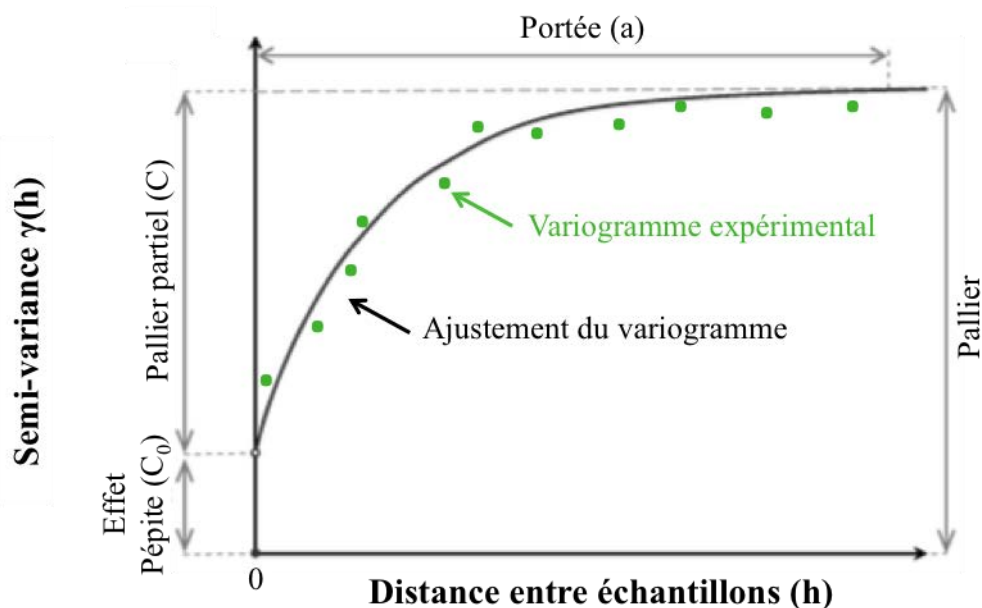


Figure 2.7. Les différents composants du semi-variogramme, exemple d'un modèle pépitique avec palier (<http://tice.agroparistech.fr>).

Dans le cadre de notre analyse, les variogrammes expérimentaux ont été ajustés par les modèles théoriques décrits dans les **Tableaux 2.7 et 2.8** (McBratney and Webster 1986). De plus une étude d'anisotropie a été menée sur nos données afin de vérifier que le variogramme n'était pas influencé par une direction dans l'espace (isotropie). Pour cela une carte variographique a été tracée.

Tableau 2.7. Synthèse de l'ajustement des variogrammes expérimentaux par des modèles théoriques pour les différentes variables étudiées, selon les deux plantes utilisées.

Ajustement des variogrammes		
Variables	luzerne	Ray-grass
Biomasse racinaire	Pépitique + linéaire	Pépitique + puissance
$\Sigma 16$ HAP	Pépitique + sphérique	Pépitique + sphérique
% 18S/16S	Pépitique + sphérique	Pépitique + sphérique + ordre 1
% GN/16S	Pépitique + sphérique + ordre 1	Pépitique + sphérique
% GP/16S	Pépitique + sphérique	x

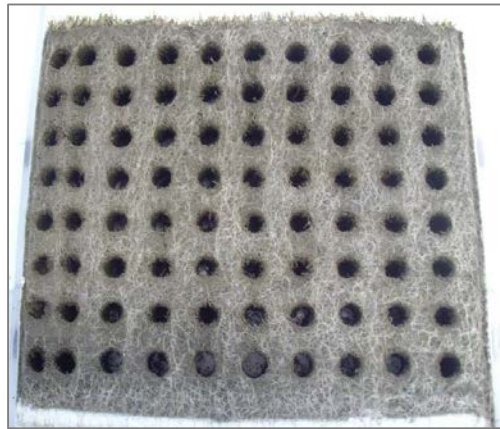
Tableau 2.8. Expression mathématique des différents modèles théoriques utilisés pour l’ajustement des variogrammes expérimentaux, avec C_0 : effet pépité, C : palier partiel, h : distance en cm, a : portée (d’après McBratney and Webster 1986).

Modèles théoriques	Expressions mathématiques
Sphérique	$\gamma_z(h) = C_0 + C \left[\frac{3h}{2a} - \frac{1}{2} \left(\frac{h}{a} \right)^3 \right], \text{ si } h \leq a$ $\gamma_z(h) = C_0 + C, \text{ si } h \geq a$
Linéaire	$\gamma_z(h) = C_0 + C$
Puissance	$\gamma_z(h) = C_0 + Ch^a$
Ordre 1	$\gamma_z(h) = C_0 + C \left(\frac{h}{a} \right)$

2.4.3.2 Estimation locale par krigeage

Le krigeage ponctuel a été utilisé afin de tracer, à partir des 56 points d’échantillonnage par dispositif, une carte avec un maillage de 10 mm, représentant une estimation de la variabilité spatiale de chaque variable mesurée. Le krigeage, considéré comme le meilleur interpolateur linéaire non-biaisé, a permis d’estimer localement les variables d’intérêts en prenant en compte la distance entre les données et le point à estimer, ainsi que la structure spatiale de la variable, notamment à partir de la modélisation du variogramme (Emery 2001).

Chapitre 3 :
Etude de la variabilité spatiale des HAP et
des populations microbiennes dans la
rhizosphère de deux plantes



L'hétérogénéité spatiale dans la rhizosphère, liée à la structure, à la croissance et à l'exsudation racinaires et aux communautés microbiennes associées, et l'hétérogénéité spatiale des teneurs en polluants, peuvent être des facteurs déterminants pour le devenir des HAP dans les sols. Notre premier objectif était d'étudier précisément la variabilité spatiale du processus de biodégradation des HAP dans deux rhizosphères très différentes et en fonction de la densité racinaire. Dans ce chapitre, l'impact de la variabilité spatiale des systèmes racinaires de la luzerne et du ray-grass sur la teneur en HAP et l'abondance des communautés microbiennes ont été étudiés dans un sol historiquement contaminé. Pour considérer cette hétérogénéité à l'échelle centimétrique, des dispositifs de type rhizotrons avec un échantillonnage adapté ont été développés et des outils de géostatistique ont été utilisés.

Deux rhizotrons (30 cm x 30 cm) remplis de sol historiquement contaminé de la friche industrielle de Neuves-Maisons (NM), dont la fraction disponible en HAP a été augmentée par une recontamination fraîche (extrait organique complexe), ont permis de cultiver pendant 37 jours la luzerne et le ray-grass. Ces deux espèces végétales ont été choisies pour leur capacité à stimuler la biodégradation des HAP et pour leur système racinaire contrasté. L'utilisation du rhizotron a permis de visualiser l'hétérogénéité spatiale du système racinaire des deux plantes, et d'échantillonner au sein des deux systèmes racinaires 56 échantillons selon une carte standardisée et spatialement codée. Une analyse multiparamétrique a permis de caractériser chacun de ces échantillons de par sa biomasse racinaire, la proportion de sol rhizosphérique, la teneur en HAP totaux et biodisponibles et l'abondance des populations bactériennes, fongiques et bactériennes potentiellement capables de dégrader les HAP à partir d'extrait d'ADN génomique. Des mesures de pH, de la teneur en sucres, en carbone organique dissous sur une sélection de 16 échantillons par dispositif, disposés selon un maillage plus grossier, ont été réalisées pour préciser la variabilité spatiale dans la rhizosphère. La variabilité spatiale de ces différents paramètres a été modélisée grâce à l'utilisation d'outils géostatistiques.

Au cours de cette étude, nous avons montré que la totalité de la fraction disponible des HAP avait été dégradée en 37 jours de croissance végétale, en parallèle de l'augmentation de l'abondance des populations dégradantes. D'autre part, une dégradation plus importante des HAP a été observée dans le rhizotron planté avec la luzerne. Malgré une absence de structure spatiale de la teneur en HAP, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un gradient vertical rhizosphérique (biomasse racinaire, teneur en sucres) spécifique de chacune des

plantes au sein des deux rhizotrons. Le développement des deux espèces végétales conduit à des gradients racinaires différents qui induisent une variabilité spatiale différente des populations microbiennes. Ainsi dans le rhizotron avec du ray-grass, l'abondance des bactéries dégradantes à Gram-positif est plus importante en profondeur où la teneur en sucres et le pH sont plus importants tandis que dans le rhizotron planté avec la luzerne, les populations fongiques sont favorisées en surface où la biomasse racinaire est plus importante. Ces travaux font l'objet d'une publication dans la revue PlosOne, référencée dans la suite du manuscrit par Bourceret et al. (in Press).

3. Mapping the centimeter-scale spatial variability of PAHs and microbial populations in the rhizosphere of two plants.

Amélia Bourceret^{1,2}, Corinne Leyval^{1,2}, Chantal de Fouquet³, Aurélie Cébron^{1,2,†}

¹ CNRS, LIEC UMR7360, Faculté des Sciences et Technologies, Bd des Aiguillettes, BP70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

² Université de Lorraine, LIEC UMR7360, Faculté des Sciences et Technologies, Bd des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

³ MINES ParisTech, Centre de Géosciences Géostatistique, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris, 35 Rue Saint-Honoré, 77305 Fontainebleau, France

† Corresponding author: aurelie.cebron@univ-lorraine.fr; phone: (+33) 383684296

Key words: contaminated soil, alfalfa, ryegrass, rhizotron, geostatistics, rhizodegradation

3.1 Abstract

Rhizoremediation uses root development and exudation to favor microbial activity. Thus it can enhance polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) biodegradation in contaminated soils. Spatial heterogeneity of rhizosphere processes, mainly linked to the root development stage and to the plant species, could explain the contrasted rhizoremediation efficiency levels reported in the literature. Aim of the present study was to test if spatial variability in the whole plant rhizosphere, explored at the centimetre-scale, would influence the abundance of microorganisms (bacteria and fungi), and the abundance and activity of PAH-degrading bacteria, leading to spatial variability in PAH concentrations. Two contrasted rhizospheres were compared after 37 days of alfalfa or ryegrass growth in independent rhizotron devices. Almost all spiked PAHs were degraded, and the density of the PAH-degrading bacterial populations increased in both rhizospheres during the incubation period. Mapping of multiparametric data through geostatistical estimation (kriging) revealed that although root biomass was spatially structured, PAH distribution was not. However a greater variability of the PAH content was observed in the rhizosphere of alfalfa. Yet, in the ryegrass-planted rhizotron, the Gram-positive PAH-degraders followed a reverse depth gradient to root biomass, but were positively correlated to the soil pH and carbohydrate concentrations. The two rhizospheres structured the microbial community differently: a fungus-to-bacterium depth gradient similar to the root biomass gradient only formed in the alfalfa rhizotron.

3.2 Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are soil persistent organic pollutants whose main sources are the anthropogenic activities linked to the coal industry. Soil PAH contamination is generally heterogeneously distributed at different scales. While being spread at the kilometer scale (Villanneau et al. 2013), PAHs can display a heterogeneous distribution leading to pollution hotspots at smaller scales due to the presence of tar balls (De Fouquet 2011); (Hybholt et al. 2011), to soil parameters, i.e. texture (Amellal et al. 2001b), organic matter content (Cornelissen et al. 2005), mineral composition (Choudhary and Mantri 2000), and to PAH compound physico-chemical properties, i.e. molecular weight, solubility (Styrishave et al. 2012), molecular structure (Tunega et al. 2009), governing adsorption, desorption and biodegradation mechanisms. Biological parameters such as plant growth and root development, and microbial community abundance and diversity, can also modify PAH distribution in the soil due to hotspots of activity in the rhizosphere.

Plants can contribute to the remediation of PAH-polluted soils. During plant growth, roots release exudates mainly composed of sugars, organic acids and amino acids (Kumar et al. 2006; Vančura and Hovadik 1965; Chaudhry et al. 2005) that constitute carbon sources for microorganisms. Root exudates can enhance PAH bioavailability (Joner et al. 2002; Joner and Leyval 2003; Sun et al. 2013), increase and activate rhizospheric microbes, and help them to degrade pollutants (Kuiper et al. 2004; Gerhardt et al. 2009) by selecting PAH-degraders (Cébron et al. 2011b; Storey et al. 2014). Thus several studies carried out in artificially (Liste and Alexander 2000; Binet et al. 2001; Joner et al. 2002; Chiapusio et al. 2007) or historically (Tejeda-Agredano et al. 2013) contaminated soils report that PAH degradation is higher in plant rhizosphere than in non-planted soil. However, other studies report that addition of ryegrass root exudates did not modify (Cébron et al. 2011b) or even reduced or inhibited (Louvel et al. 2011) PAH degradation, as compared to unplanted soil. Spatial and temporal variability of rhizospheric phenomena depending on root age and root exudate composition could potentially explain these contrasting observations.

On the other hand, the PAH remediation potential varies according to plant species (Liste and Prutz 2006). Soil root structuration, root exudate concentration and composition, humidity, and chemical modifications induced by roots, depend on plant species type and could contribute explaining the temporal and spatial variations of rhizospheric processes during

plant development (Hinsinger et al. 2005). The diversity of the rhizosphere microbial community, potentially involved in pollutant biodegradation, is linked to root exudate composition, which in turn depends on plant species (Shann and Boyle 1994; Marschner et al. 2001), root age, and soil characteristics (Anderson et al. 1993). Different plant species have been tested in PAH rhizoremediation assays (D'Orazio et al. 2013; Kuiper et al. 2004; Phillips et al. 2008). Leguminous and grass plants are often selected because they are able to grow on nutrient-poor soils. Grasses develop a large fibrous root system that allows them to colonize a large area and favors interaction between roots, microorganisms and pollutants (D'Orazio et al. 2013). The impact of plants on PAH dissipation seems to vary according to proximity to growing roots (Corgié et al. 2003), with a mm- to the cm-scale-spatial gradient of bacterial communities (Corgié et al. 2004). Similar PAH gradients were observed in the rhizosphere of different plant species in rhizoboxes (Ma et al. 2012a) and in field study (Ling et al. 2013). The heterogeneous diffusion of root exudates, as shown in alfalfa rhizosphere (Hafner et al. 2014), could also explain the spatial heterogeneity in PAH dissipation, but was not shown in a polluted soil. Although numerous microcosm experiments using spiked soils have been designed to study temporal and spatial variability of rhizospheric processes, most devices have so far focused on distance gradients from the root but did not study the structuration at the whole root system or rhizosphere scale. The spatial variability of rhizospheric processes along the entire root system, taking into account roots of different ages and plants belonging to different families, is not yet well understood. These aspects could be further investigated using new combinations of tools, including visualization and modelling of the measured processes at the centimeter scale corresponding to the whole plant rhizosphere.

Geostatistical tools make it possible to characterize and quantify spatial variability. They are commonly used to study PAH contamination at the regional or site scale. Variogram studies have been used to highlight short distances spatial variability of hydrocarbon concentrations in contaminated soils with studies performed at the meter to hectometer scale (Demougeot-Renard et al. 2004; Demougeot-Renard and De Fouquet 2004; De Fouquet et al. 2011), and at the decimeter to centimeter scale (Faucheux et al. 2008; De Fouquet et al. 2010). These studies showed large spatial variability of hydrocarbon concentrations at short distances, with a decimeter-range structure. Geostatistical tools are also used to describe and establish spatial links between PAH contamination and soil physical, chemical and biological characteristics. Positive relationships between PAH hotspots and organic carbon concentrations (Bengtsson and Törneman 2009), fungal biomass (Bengtsson et al. 2010), bacterial diversity and ring-

hydroxylating dioxygenase gene abundance (Bengtsson et al. 2013), was established at the meter scale in aged-polluted soils. At finer (millimeter to centimeter) scale in urban roadside soil, the spatial heterogeneity of PAH-mineralization potential (Hybholt et al. 2011) was highlighted, but the distribution of PAHs and PAH-degraders was not correlated (Johnsen et al. 2014). In contrast, other studies have demonstrated covariation between PAH concentration and spatial pattern of microbial diversity (Törneman et al. 2008; Mukherjee et al. 2014). Although few studies used geostatistical tools to link pollutants with microbial community in PAH-contaminated soils, to our knowledge none of them considered plant rhizosphere at the centimeter scale, mapping the whole root system and its impact on the fate of PAHs.

We hypothesized that contrasted results concerning PAH-biodegradation in the rhizosphere are linked to spatial heterogeneity of rhizosphere processes, depending on plant species and root age, and varying with depth into the soil. To test this hypothesis, we developed a rhizotron device to study the rhizosphere at the centimeter-scale in order to consider and sample the whole root system. The device was adapted to visualize the rhizosphere structure after *c.a.* 1 month of plant growth. Thus we sampled a large number of points and performed a geostatistical study to map rhizosphere processes as an output of the fate of PAHs. We used a historically aged PAH-contaminated soil in which we increased organic pollutant bioavailability by spiking it with a complex organic extract at the start of the experiment. We measured biological and physical parameters in the initial spiked soil and after plant incubation, but we only compared their spatial variability after plant incubation. We grew two plant species (alfalfa and ryegrass) in separate rhizotrons, and then we carried out a geostatistical study to model the spatial variability of PAH biodegradation, microbial (bacterial and fungal) abundance, PAH-degrading bacterial abundance and root growth in the whole rhizosphere at the centimetre-scale in order to accurately map these variables.

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Soil preparation

The experiments were carried out on a PAH- and heavy metal-contaminated soil from an aged coking plant site (Neuves-Maisons (NM), Lorraine, France) previously described in Ouvrard et al. (2011). Coke production from coal is an industrial process performed to obtain a powerful combustible used in the reduction of iron ore to steel in blast furnaces. This process generates many sub-products during the coal combustion, including PAH containing tar. Soil

texture, agronomic and chemical characteristics and PAH concentrations are presented in **Table 3.1**. The soil was air-dried and sieved at 2 mm before use. The soil contained 1224 mg of $\Sigma 16$ PAHs and 40 mg of $\Sigma 15$ cyclodextrin-extractable PAHs per kg of dw soil. PAH content was artificially increased by spiking the soil with a complex organic pollutant extract (Cébron et al. 2013). The extract was prepared by mixing chloroform (2.470 l) with NM soil (2.250 kg). After 1h, the chloroform organic pollutant extract (0.779 l) was collected and spread onto 0.450 kg of a new NM soil aliquot. This spiked soil was air-dried for 2 days with frequent mixing under a fume hood to remove residual chloroform. The spiked soil was mixed to 4.050 kg of NM soil (non-exposed to chloroform) in a one-tenth ratio and separated in two batches to fill both rhizotrons. Two rhizotron devices were filled with spiked soil (1524 mg of $\Sigma 16$ PAHs per kg of dw soil). Fifteen aliquots from both batches of spiked soil (30 T_0 sub-samples) were stored at -80°C for further analyses of T_0 .

Table 3.1. Soil characteristics and PAH contamination. Granulometry, agronomic and chemical properties were measured at the LAS-INRA laboratory (Arras, France). Different letters indicate significant differences (Student t-test, $p < 0.05$) in total and available PAH concentrations before and after spiking.

Parameters	Granulometry (g.kg^{-1})					Agronomic characteristics				Chemical characteristics			$\Sigma 16$ PAHs (US-EPA) (mg.kg^{-1})		$\Sigma 15$ bioavailable PAHs (mg.kg^{-1})		
	Clay (< 2 μm)	Fine silt (2/20 μm)	Coarse silt (20/50 μm)	Fine sand (50/200 μm)	Coarse sand (200/2000 μm)	N total (g.kg^{-1})	C/N	TOC (g.kg^{-1})	Organic matter (g.kg^{-1})	pH	CaCO ₃ (g.kg^{-1})	Available P ₂ O ₅ (Olsen) (g.kg^{-1})	CEC ($\text{cmol}^+\text{.kg}^{-1}$)	Before spiking	After spiking	Before spiking	After spiking
NM soil	108	114	78	89	593	2.34	24.9	58.2	101	7.49	17	0.059	9.83	1224 _b \pm 184	1524 _a \pm 174	40 \pm 13 _b	61 \pm 15 _a

3.3.2 Rhizotron device and sampling

Rhizotron devices were poly-methyl methacrylate boxes (30 cm high x 30 cm long x 2.5 cm wide) with a removable front face, and holes of 0.4 cm diameter at the bottom to avoid water stagnation. Bolting cloth (5 μm) was placed at the bottom and at the front face of the rhizotron to protect the root system and prevent it from adhering to the wall of the device. Two rhizotrons were filled with spiked soil and adjusted to 80% of the soil water holding capacity (WHC) (corresponding to 203 ml per kg of dw soil). Two plant species were grown in independent rhizotrons by seeding 4 g of alfalfa (*Medicago sativa* var. Europe; named Alf in the study) or ryegrass (*Lolium multiflorum* var. Podium; named Rye in the study) seeds (corresponding to 22.3 ± 2.0 seeds per cm^2). After two days of seed germination, the devices were placed in a plant growth chamber with controlled conditions (22°C /18°C day/night, 80% relative humidity, c.a. 250 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 hours photoperiod) and were watered on the top to maintain soil humidity at 80% of the WHC by weighing the devices.

After 37 days (T_{37}), the front faces of the two rhizotrons were opened to allow sampling using a syringe whose bottom had been cut off (1.6 cm diameter, 2.5 cm long). We took 56 core samples per rhizotron (8 depths, 7 samples per depth), using a squared 3-cm grid pattern (3 cm between the core centers). Therefore we took a total of 112 samples for the two rhizotrons. The rhizotron device and the sampling grid are presented in **Figure 3.1**.

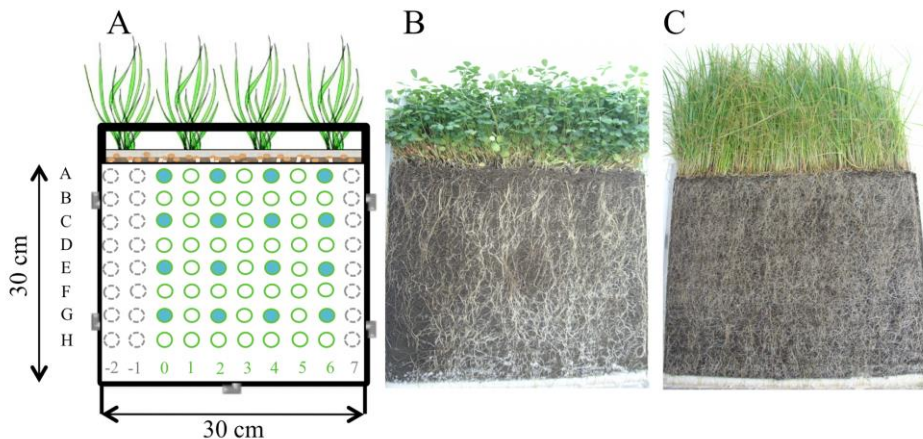


Figure 3.1. Illustration of the rhizotron device. (A) Sampling map showing the 56 samples (in green). The 8 depths are labeled from A to H and the 7 replicates are labeled from 0 to 6. Twenty-four supplemental samples (in gray) were used for soil humidity measure measurements. On sixteen samples per device (in blue) further analyses of pH, bioavailable PAHs, carbohydrates and dissolved organic carbon (DOC) were performed. Pictures of alfalfa (B) and ryegrass (C) rhizotron devices after 37 days.

For each sample, roots were separated and rinsed 3 times with sterile water to remove the adhering rhizosphere soil. Roots were air-dried at 60°C and weighed to estimate dry root biomass. The rhizosphere soil was collected from the first rinsing water. After centrifugation the rinsing water was removed and the rhizosphere soil was dried over night at room temperature. The ratio between rhizosphere soil and bulk soil was calculated by weighing the two soil fractions. Then rhizosphere soil was mixed to the bulk soil to obtain homogeneous soil samples. One gram of soil from 16 samples (4 samples from depths of 2, 8, 14, and 20 cm) was processed for available PAH extraction as described below, and all the other samples were stored at -80°C for further analyses. pH, total organic carbon and sugar concentrations were measured from these 16 soil solutions in distilled water (1:5 w/v ratio), respectively using a pH-meter electrode (BioBlock scientific, pHM210 Radiometer analytical), a total organic carbon analyzer (TOC-V CSH, Shimadzu) and an ion-exchange chromatograph (ICS 5000, Dionex, Thermo Scientific) equipped with a CarboPac SA10 column (Dionex, Thermo Electron). Carbohydrate analyses were performed at the certified facility in Functional Ecology (PTEF OC O81) from UMR 1137 EEF and UR 1138 BEF in the INRA Nancy-Lorraine research center. At each depth, 3 other samples were collected to measure soil humidity by weighing the soil sample before and after drying at 60°C for two days.

3.3.3 Analysis of total and available PAHs

Total PAHs were extracted from 0.250 g of 30 T₀ and 112 T₃₇ samples of lyophilized soil, using an Accelerated Solvent Extractor (ASE350 Dionex ®) with dichloromethane (130°C, 100 bars). Available PAHs were extracted with 20 ml of an aqueous solution of hydroxypropyl-β-cyclodextrin (50 mM) (Acros organics, New Jersey, USA) (Reid et al. 2000) from 1 g of 8 T₀ (4 aliquots from both batches) and 32 T₃₇ samples of fresh soil in Teflon™ FEP (fluoroethylene propylene) Oak Ridge Centrifuge tubes (Nalgene, USA). After stirring on a rotary shaker for 16 h at 24 °C and 2 centrifugation steps, PAHs were extracted from the aqueous supernatant (*c.a.* 30 ml) by adding 24 ml of dichloromethane. Dichloromethane extracts from total and available PAH fractions were evaporated under nitrogen flow and diluted in 20 ml and 5 ml of acetonitrile, respectively. PAHs were quantified by injecting 10 µl of extract in an HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography, Dionex Ultimate 3000) system, using a 100-mm long and 4.6-mm internal diameter separation column (SupelcoAscendis Express C10), with 2.6-mm granulometry. A UV detector (254 nm) was used to individually detect the 16 US-EPA PAHs (Keith and Telliard 1979) for total extraction, and a fluorescence detector was used to detect 15 PAHs

(acenaphthylene excluded) at low concentrations in the bioavailable extract.

3.3.4 DNA extraction

Total nucleic acids were extracted from 0.5 g of the 6 T₀ and 112 T₃₇ samples of soil using a FastDNA SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, France), and resuspended in 100 µl of DES (Dnase-free water). DNA concentrations and purity (A₂₆₀/A₂₈₀ ratio) were measured using a spectrophotometer (UV1800, Shimadzu) equipped with a Tray cell adapter (Hellma).

3.3.5 Real-time PCR quantification of fungal, bacterial and PAH-degrading bacterial communities

The abundance of fungi, bacteria, and PAH-degrading bacteria was evaluated by real-time PCR as previously described (Cébron et al. 2008; Thion et al. 2012), using the primer sets Fung5F /FF390R (Lueders et al. 2004), 968F /1401R (Felske et al. 1998) and PAH-RHD_αGN F/R, PAH-RHD_αGP F/R (Cébron et al. 2008), which target the fungal 18S rRNA gene, the bacterial 16S rRNA gene, and the PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD_α) gene from Gram-negative (GN) and Gram-positive (GP) bacteria, respectively. Amplification reactions (20 µl final volume) were performed using 10 µl of iQ SYBR green SuperMix (Bio-Rad), 0.8 µl of each primer (10 µM), 0.4 µl of 3% BSA (bovine serum albumin) solution, 0.2 µl of DMSO (dimethyl sulfoxide), 0.08 µl of T4 bacteriophage gene 32 product (MP Biomedicals, France) and 1 µl of ten-fold diluted DNA, corresponding to 3.1 to 7.8 ng. Quantification was performed using a CFX96 Real-Time PCR detection system (Bio-Rad). For a description of standard plasmid dilution series (10⁸ to 10¹ copies µl⁻¹) and temperature profiles, see Cébron et al. (2008) and Thion et al. (2012). Data were expressed in percentages of fungi or PAH-degrading bacteria relative to 16S rRNA gene copies.

3.3.6 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using XLStat 2013 software (Addinsoft). Fisher tests were performed to compare variance of the soil PAH content at T₀ and at T₃₇, and percentages of fungi to bacteria and Gram-negative PAH-degrading bacteria, respectively at depths 2 or 5 cm depth, according to each plant. Student t-tests were performed to determine statistical differences in available PAH (n=16 samples per rhizotron), PAH concentrations, root biomass and abundance of the microbial (bacterial, fungal and PAH-degrading bacterial) community (n=56 samples per rhizotron) over time, and to test for a plant effect. One-way analysis of variance (ANOVA, with p<0.05) followed by a Newmans-Keuls multiple comparison test

was performed for each rhizotron to detect the impact of depth (n=7 samples per depth). After standardization (z-score) of all data and labelling of samples according to their sampling coordinates independently of the rhizotron, a principal component analysis (PCA) was carried out, and a correlation circle was drawn. Correlation between soil properties was studied by calculating Pearson's correlation matrix (**Annexe 3.1**). Correlation between the parameters and depth (or root biomass) was described using the correlation ratio η^2 in addition to the Spearman's correlation coefficient r (η^2 is equal to r^2 if the correlation is linear, and is greater than r^2 in the other cases) because the relationship between measured parameters and depth (or root biomass) is not necessarily linear.

3.3.7 Geostatistical analysis

Geostatistics was used to study and model the spatial distribution of parameters that can be spatially structured in the soil, to verify if neighboring samples were more similar to one another than remote samples, i.e. if the data presented some kind of spatial autocorrelation. Many interpolation algorithms are available and generally provide different results (**Annexe 3.2**). Among those, linear optimal mapping (kriging) is defined by two criteria (i) non-bias (the average estimation error is zero), and (ii) precision (quantified by the variance of the estimation error, that must remain as low as possible).

Mapping was performed in two steps according to Chilès and Delfiner (2012): (i) an exploratory step of statistical and variographic analyses to characterize spatial variability, and (ii) a step of spatial variability modeling and estimation by kriging for mapping. The spatial structure of the variables was characterized by a sample variogram, which represents half of the mean quadratic difference (semivariance) between the values at two points according to their spacing. The sample variogram in the direction \vec{s} is defined (putting $\vec{h} = h \vec{s}$) by $\gamma^*(\vec{h}) = \frac{1}{2n(\vec{h})} \sum_{i=1}^{n(\vec{h})} (z(x_i + \vec{h}) - z(x_i))^2$, where x represents the experimental data points, $z(x)$ the variable and $n(\vec{h})$ the number of point pairs separated by the distance \vec{h} . The behavior of the variogram with distance synthesizes the spatial variability of the variable z . The semi mean quadratic difference is usually low at short distances, and increases with distance. It can reach a sill when samples are independent from each other at greater distances than the range. Variogram maps were drawn to verify if data distribution followed a directional trend and revealed anisotropy, and directional variograms were calculated. Variograms were calculated at 3-cm steps (the data grid lag). ISATIS geostatistical software was used

(<http://geovariances.com>).

Estimating the variable z apart from the data points requires modeling the sample variogram by a variogram function, noted $\gamma(\vec{h})$. This function $\gamma(\vec{h})$ was used to calculate the optimal linear estimator, also called “kriging”. As some variables are non-additive, “punctual” estimation, i.e. on the same support as the data, was carried on. Spatial distribution of soil parameters (PAH concentration, root biomass, microbial abundance) was modeled by kriging from a grid of 56 samples per rhizotron. Concerning the percentage of Gram-positive PAH-degrading bacteria in ryegrass, a moving 17-cm radius circular neighborhood, about half of the rhizotron, was selected. For all the other variables, kriging was performed in unique neighborhoods. The results of punctual kriging were slightly smoothed to draw the maps.

3.4 Results

3.4.1 Edaphic parameters and microbial community after 37 days

After thirty-seven days of plant growth (T_{37}), roots had abundantly developed over the whole sampling area in the two rhizotrons. As expected with two plants belonging to two different families, root structure was plant specific (**Figure 3.1**). Soil humidity level, mannitol, xylose and fructose contents were significantly ($p < 0.05$) higher in the ryegrass ($59.5 \pm 2.6 \%$, 3.07 ± 2.03 , 0.17 ± 0.23 , $1.63 \pm 1.02 \text{ mg.kg}^{-1}\text{dw soil}$) than in the alfalfa ($43.8 \pm 7.4 \%$, 1.18 ± 1.67 , 0.00 ± 0.01 , $0.28 \pm 0.63 \text{ mg.kg}^{-1}\text{dw soil}$) rhizotron (**Table 3.2**). The mannitol and fructose contents were lower at shallow depth in the ryegrass rhizotron. The dissolved organic carbon (DOC) and inositol contents were significantly higher in the alfalfa (189.73 ± 64.65 , $0.64 \pm 0.52 \text{ mg.kg}^{-1}\text{dw soil}$) than in the ryegrass (121.34 ± 36.62 , $0.16 \pm 0.07 \text{ mg.kg}^{-1}\text{dw soil}$) rhizotron. The inositol content was significantly higher at shallow depth for alfalfa, and specifically higher at 14 cm depth for ryegrass. pH, sucrose and glucose contents presented significant vertical gradients with depth. Globally, the soil was more acidic at shallow depth in both rhizotrons, whereas sucrose and glucose contents were lower at shallow depth in the ryegrass rhizotron only.

Table 3.2. Soil characteristics and carbohydrate concentrations after 37 days of alfalfa (Alf) or ryegrass (Rye) growth, at four depths (2, 8, 14, and 20 cm from the surface of the rhizotron). Values are means and standard deviations of three and four replicates for humidity and other parameters, respectively. The effect of plant species was evaluated using Student t-tests ($p < 0.05$). The effect of depth was tested separately for each plant species after 37 days using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparison test and letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Conditions		Soil characteristics					Sugar concentrations (mg.kg ⁻¹)				
Samples	Plant	Depth (cm)	Humidity (%)	pH	DOC (mg.kg ⁻¹)	Inositol	Mannitol	Sucrose	Glucose	Xylose	Fructose
Alf_T37-2	Alfalfa	2	39.16 ± 4.99	6.91 ± 0.22 ^b	210.16 ± 120.05	1.19 ± 0.23 ^a	0.00 ± 0.00	0.28 ± 0.37	0.29 ± 0.43	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.13
Alf_T37-8	Alfalfa	8	42.34 ± 6.66	7.25 ± 0.57 ^a	145.85 ± 29.92	0.32 ± 0.15 ^b	1.45 ± 1.72	0.59 ± 0.87	0.21 ± 0.25	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.13
Alf_T37-14	Alfalfa	14	44.67 ± 7.85	7.34 ± 0.02 ^a	180.13 ± 25.14	0.23 ± 0.18 ^b	0.65 ± 0.96	0.55 ± 0.71	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.04
Alf_T37-20	Alfalfa	20	44.40 ± 9.57	7.38 ± 0.03 ^a	222.78 ± 15.93	0.82 ± 0.65 ^{ab}	2.60 ± 2.23	3.34 ± 4.23	0.90 ± 1.09	0.01 ± 0.02	0.89 ± 1.13
Rye_T37-2	Ryegrass	2	57.46 ± 1.24	7.04 ± 0.15 ^c	115.70 ± 39.70	0.16 ± 0.04 ^{ab}	0.39 ± 0.48 ^b	0.21 ± 0.26 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00	0.66 ± 0.93 ^b
Rye_T37-8	Ryegrass	8	58.35 ± 3.22	7.23 ± 0.03 ^b	113.19 ± 32.19	0.07 ± 0.07 ^b	2.84 ± 2.16 ^a	0.98 ± 0.36 ^a	0.27 ± 0.33 ^{bc}	0.34 ± 0.18	1.44 ± 0.63 ^{ab}
Rye_T37-14	Ryegrass	14	57.77 ± 1.63	7.32 ± 0.03 ^{ab}	123.06 ± 43.92	0.24 ± 0.05 ^a	4.73 ± 0.42 ^a	1.17 ± 0.34 ^a	0.82 ± 0.24 ^a	0.20 ± 0.28	2.48 ± 0.93 ^a
Rye_T37-20	Ryegrass	20	61.64 ± 1.75	7.40 ± 0.03 ^a	133.43 ± 42.84	0.16 ± 0.03 ^{ab}	4.33 ± 0.41 ^a	0.81 ± 0.27 ^a	0.62 ± 0.41 ^{ab}	0.15 ± 0.26	1.93 ± 0.85 ^{ab}
<i>Student t-tests</i>	Plant effect		Rye > Alf	n.s.	Alf > Rye	Alf > Rye	Rye > Alf	n.s.	n.s.	Rye > Alf	Rye > Alf

3.4.1.1 PAH contamination

Spiking the soil with an organic pollutant extract significantly increased ($p < 0.05$) the total PAH concentration in the soil from $1224 \pm 184 \text{ mg.kg}^{-1}$ dw soil before spiking to $1524 \pm 174 \text{ mg.kg}^{-1}$ dw soil at T_0 just after spiking, i.e. a 20% increase in contaminants. The bioavailable PAH fraction was also increased by 34% (**Table 3.1**). The total PAH concentration decreased significantly ($p < 0.05$) over time in both rhizotrons, down to 1090 ± 347 and $1220 \pm 287 \text{ mg.kg}^{-1}$ dw soil in the alfalfa and ryegrass rhizotrons (T_{37}), respectively, corresponding to 29% and 19% decreases relative to initial contamination of their respective T_0 batches (**Figure 3.2**).

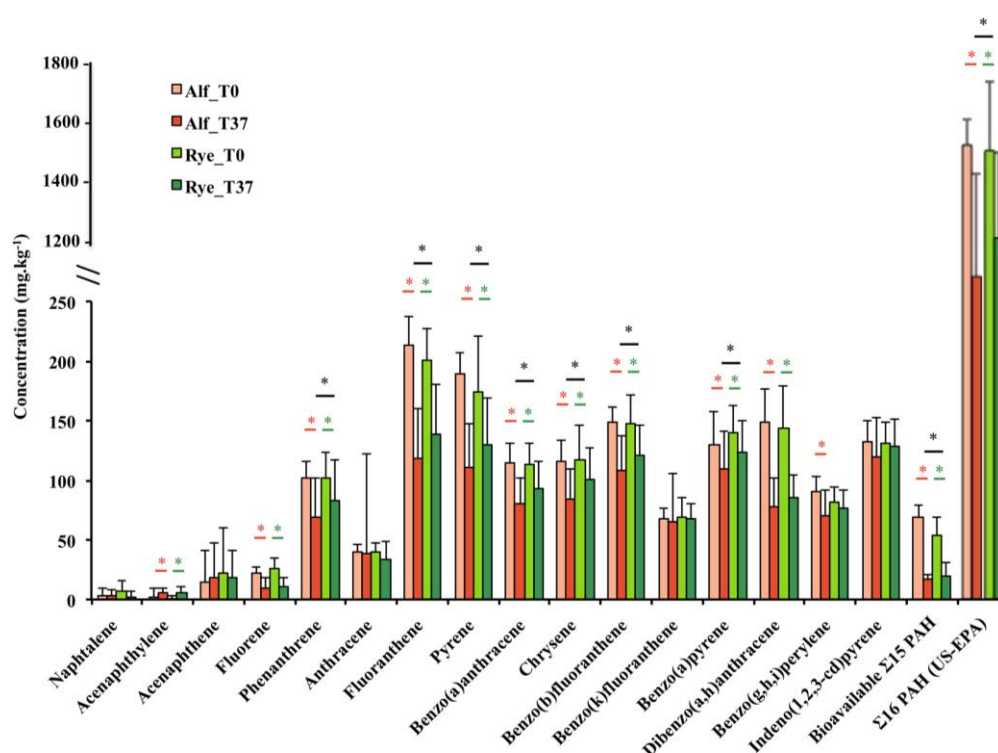


Figure 3.2. PAH contamination (sum of 16 US-EPA PAHs and sum of 15 available PAHs) over time (at T_0 and at T_{37}) and depending on the plant species (orange: alfalfa, Alf; green: ryegrass, Rye). Values are means and standard deviations of 15 and 56 replicates (PAHs), and 4 and 16 replicates (available PAHs) for the T_0 and T_{37} conditions, respectively. The effects of time and plant species were evaluated separately using Student t-tests ($p < 0.05$). Green and orange asterisks indicate significant changes in PAH concentrations between T_0 and T_{37} in the ryegrass and alfalfa rhizotrons, respectively. Black asterisks indicate significant differences in PAH concentrations between the ryegrass and alfalfa rhizotrons at T_{37} .

At T_{37} , total PAH concentration was significantly ($p < 0.05$) lower in the alfalfa than in the ryegrass rhizotron. Most PAH concentrations decreased in both rhizotrons, independently of PAH molecular weight. However, at T_{37} , the concentrations of seven compounds (phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene and benzo(a)pyrene) were significantly ($p < 0.05$) lower with alfalfa than with ryegrass.

Bioavailable PAH concentrations ($\Sigma 15$ cyclodextrin-extracted PAHs) decreased significantly ($p < 0.05$) over time in both rhizotrons, and reached 16 and 20 $\text{mg.kg}^{-1}\text{dw soil}$ at T_{37} , corresponding to 76% and 63% decreases for alfalfa and ryegrass, respectively, relatively to initial mean values of their respective T_0 batches. With alfalfa only, the concentration in bioavailable PAHs was significantly ($p < 0.05$) lower ($16 \pm 4 \text{ mg.kg}^{-1}\text{dw soil}$) than in the original soil ($40 \pm 13 \text{ mg.kg}^{-1}\text{dw soil}$) before spiking (**Table 3.1**).

3.4.1.2 Microbial community

At T_0 and T_{37} , bacterial abundance (mean value of $2.32 \times 10^9 \pm 1.12 \times 10^9$ 16S rRNA gene copies g dw soil^{-1}) was two hundred times greater than fungal abundance (mean value of $1.08 \times 10^7 \pm 1.26 \times 10^7$ 18S rRNA gene copies g dw soil^{-1}) (**Figure 3.3**). Bacterial and PAH-degrading bacterial abundance values increased significantly ($p < 0.05$) over time and were significantly ($p < 0.05$) higher at T_{37} for alfalfa than for ryegrass, and so were fungal abundance values. Globally, at T_{37} the PAH-degrading bacterial community was dominated by Gram-positive bacteria. The Gram-negative over Gram-positive ratios of bacterial PAH-degrading genes were 1:5 and 1:14 for alfalfa and ryegrass, respectively. The percentage of Gram-positive PAH-degrading bacteria increased 6-fold over time for both plants, while the percentage of Gram-negative PAH-degrading bacteria increased two-hundred fold only in the soil of the alfalfa rhizotron.

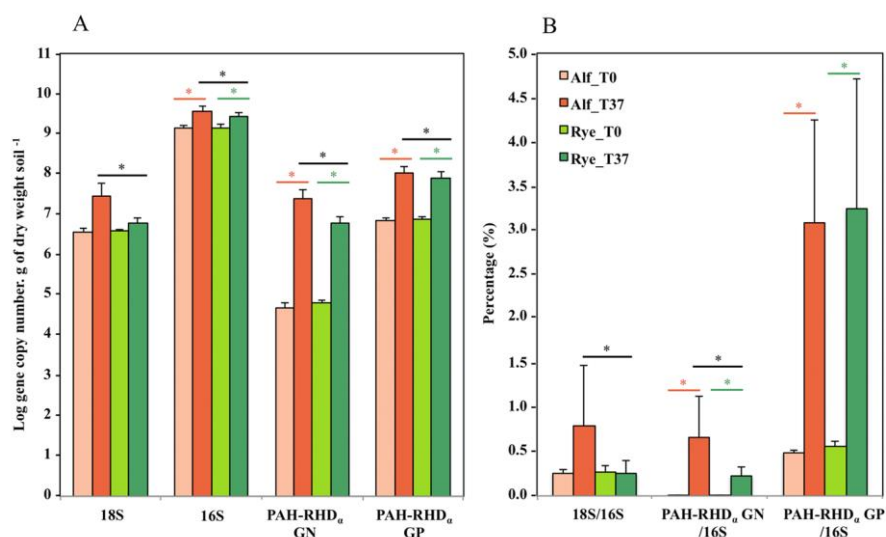


Figure 3.3. Abundance values (A) and percentages (B) (relative to 16S rDNA) of fungal, bacterial and PAH-degrading bacterial communities over time (at T_0 and at T_{37}) and depending on the plant species (orange: alfalfa, Alf; green: ryegrass, Rye). Values are means and standard deviations of 3 and 56 replicates for T_0 and T_{37} , respectively. The effects of time and plant species were evaluated separately using Student *t*-tests ($p < 0.05$). Green and orange asterisks indicate significant changes in microbial community percentage or abundance between T_0 and T_{37} in the ryegrass and alfalfa rhizotron, respectively. Black asterisks indicate significant changes in microbial community percentage or abundance between the two plants at T_{37} .

3.4.2 Spatial variability of PAH, microbial community and rhizosphere parameters

3.4.2.1 Multivariate analysis

Multivariate exploratory analysis was performed to highlight the parameters allowing discriminating samples. The two axes of the principal component analysis (PCA) taking into account depth, the percentage of fungi to bacteria, the percentage of Gram-negative and Gram-positive PAH-degrading bacteria, PAH concentration, root biomass, and weight of rhizosphere soil, explained 37.9 % of total variability (**Figure 3.4**).

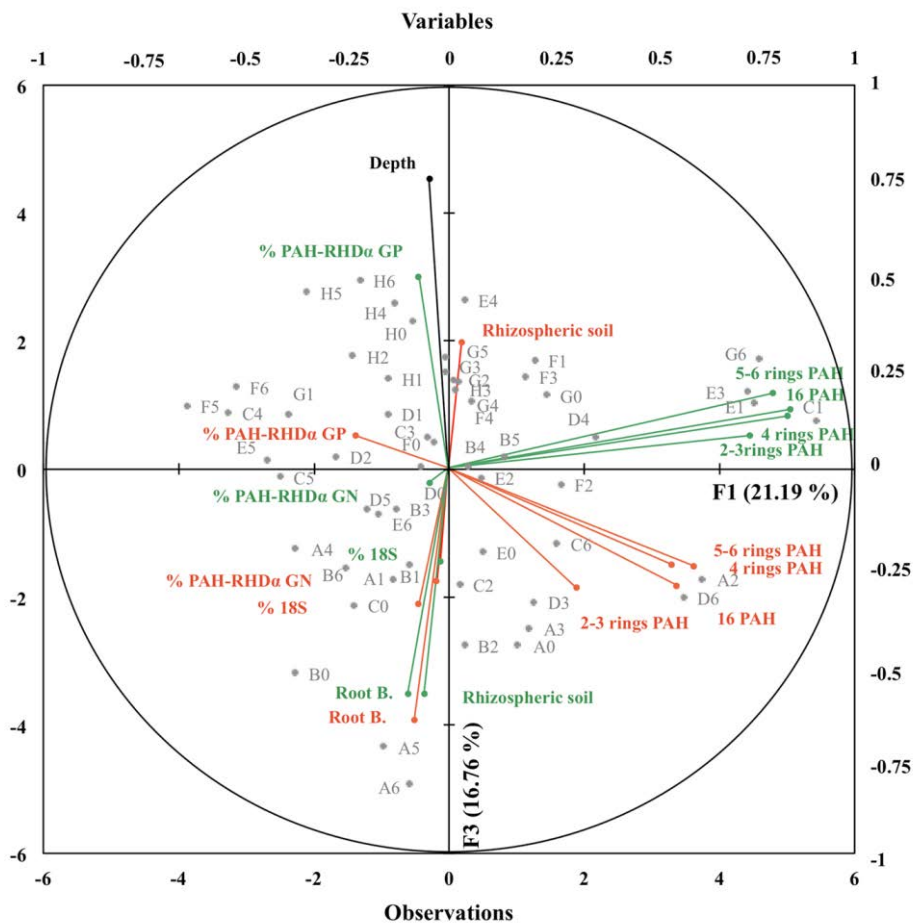


Figure 3.4. Principal component analysis (PCA) and correlation circle generated using depth, percentages (gene abundance relative to 16S rRNA gene abundance) of fungal (18S/16S) and PAH-degrading bacterial (% PAH-RHD_α GN and GP) communities, root biomass (Root B.), weight of rhizosphere soil, sum of 16 (US-EPA) PAH concentrations (16 PAHs), 2-3-ring PAHs (naphtalene, acenaphtylene, acenaphtene, fluorene, phenanthrene, anthracene), 4-ring PAHs (fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chryzene), 5-6-ring PAHs (benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene) for the 56 samples (noted A to H for the 8 depths and 0 to 6 for the 7 replicates, as shown in Figure 1) from the alfalfa (orange) and ryegrass (green) rhizotrons.

The F3 axis (explaining 16.8 % of the variability) was chosen instead of F2 axis (explaining 17.4 % of the variability) because the F3 axis better separates the depth and plant parameters. On the correlation circle, biological (percentages of fungal and bacterial communities) and rhizosphere (weight of rhizosphere soil and root biomass) variables were separated from PAHs on the 1st axis (F1). For each plant, PAHs (Σ 16 PAHs and 2-3, 4 and 5-6 cycles) were grouped together, indicating that all PAH concentrations evolved similarly over the 37 days, independently of their molecular weight. Separation of PAH concentration between the two plants on the 2nd axis (F3) suggests that PAH concentrations were largely influenced by the plant species. The impact of depth on sample variability was also highlighted by the 2nd axis (F3). Depth seemed negatively correlated with most biological variables similarly for both plants, particularly with the root biomass and proportion of rhizospheric soil. Negative and positive correlations of the percentage of fungi to bacteria in alfalfa, and the percentage of Gram-positive PAH-degrading bacteria in ryegrass were observed with depth, respectively.

3.4.2.2 *Scatter plot analysis*

To better understand the impact of depth and root biomass on the other measured parameters, scatter plots were drawn and corresponding correlation coefficients given (**Figure 3.5 and Annexe 3.3**). At T₃₇, the percentage of fungi to bacteria, and of Gram-positive PAH-degrading bacteria, as well as the root biomass appeared to be spatially structured by depth (**Figure 3.5**). The percentage of fungi to bacteria of the alfalfa rhizosphere ($\eta^2 = 0.62$, $r = -0.49$) and the root biomass of the two rhizospheres ($\eta^2 = 0.60$, $r = -0.64$; $\eta^2 = 0.37$, $r = -0.53$) were negatively correlated with depth, whereas the percentage of Gram-positive PAH-degrading bacteria was positively ($\eta^2 = 0.71$, $r = 0.77$) correlated with depth for ryegrass. More precisely, root biomass decreased regularly with depth in the ryegrass rhizosphere, whereas it was very much contrasted between the two shallow depths and the other depths in the alfalfa rhizosphere.

In the alfalfa rhizotron, the percentage of fungi to bacteria and the percentage of Gram-negative PAH-degrading bacteria were greater in the first and second shallow depths, respectively. In the ryegrass rhizotron, these two parameters were significantly less dispersed at the same depths, and per-depth mean values were globally lower than in the alfalfa rhizotron. The percentages of Gram-positive PAH-degrading bacteria were differently distributed across space between the two plants although mean values were close (3.08 and 3.24 % for alfalfa and ryegrass, respectively). Per-depth mean values tended to increase in the

ryegrass rhizosphere, but not in the alfalfa rhizosphere. Thus, total PAH concentrations did not exhibit spatial co-variation with depth. We found no significant correlation between PAH concentrations, percentages of Gram-negative PAH-degrading bacteria and depth for either plant. Moreover, there was no significant co-variation between root biomass and microbial community and PAH concentration parameters, neither for alfalfa nor for ryegrass (Annexe 3.3).

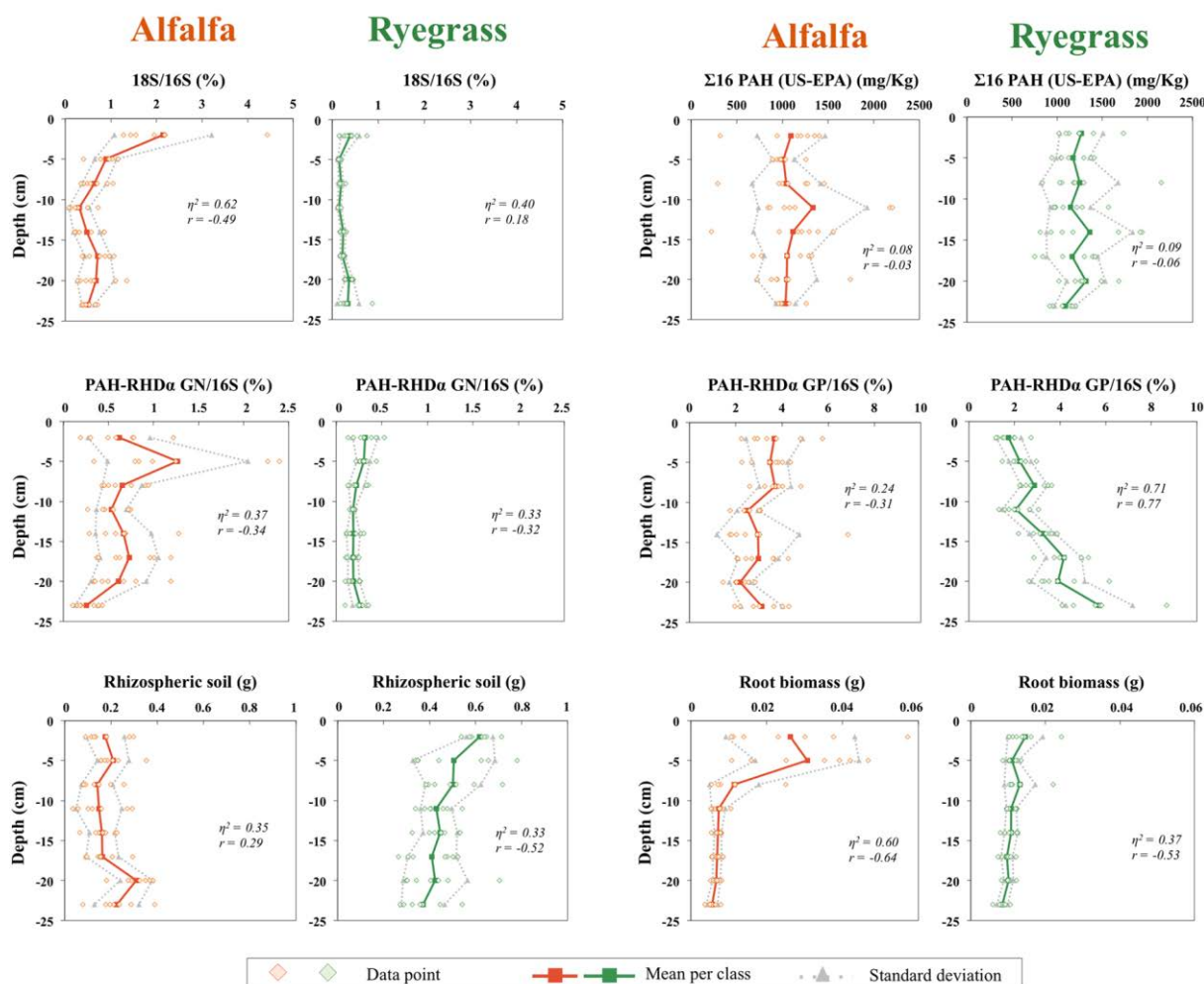


Figure 3.5. Relationship between percentages of fungal (18S/16S) and PAH-degrading bacterial communities (PAH-RHD α GN and GP/16S), sum of 16 PAH concentrations, weight of rhizosphere soil, root biomass, and rhizotron depth for alfalfa (orange) and ryegrass (green). Correlation clouds show the data from the 56 soil samples (diamonds). Mean values ($n=7$) per class (squares and full line) and class standard deviations (triangles and dotted lines) are represented. For each relationship, the Spearman's correlation coefficient (r) and the non-linear correlation coefficient (η^2) were calculated.

3.4.2.3 Variographic analysis and mapping

Although directional variograms and variographic maps indicated anisotropy, isotropic modeling was chosen because anisotropy was low or impacted by a few large values,

preventing map distortion by insufficiently robust modeling. Sample variograms of the percentage of Gram-positive PAH-degrading bacteria in alfalfa and of total PAHs for both plants were “flat”, with a large nugget effect (**Figure 3.6**). Automatic fitting was not used for the variogram of total PAH concentrations in the ryegrass rhizotron, and a short-range structured component was introduced to avoid a uniform map.

Kriging estimation showed that data from close sampling point could be very different. Concerning root biomass in alfalfa and the percentage of fungi to bacteria in ryegrass, increasing variograms were automatically fitted with large range components: the non-stationarity of these parameters can be seen as spatial correlation to a large distance. Kriging estimation confirmed that root biomass was negatively correlated with depth in the alfalfa rhizosphere. Root biomass variogram indicates non-stationarity at a higher order.

The percentage of Gram-negative PAH-degrading bacteria in the ryegrass rhizosphere presented parabolic variograms and fitting indicated a range of 15 cm. A larger range was observed for the percentage of fungi to bacteria, the percentage of Gram-negative PAH-degrading bacteria and root biomass in the alfalfa rhizosphere. Root biomass in ryegrass presented less stationary fitting, with a 1.8-exponent component. Kriging of data at T₃₇ confirmed the negative depth gradient of the percentage of fungi to bacteria in the alfalfa rhizosphere. Moreover, mapping allowed us to visualize higher abundance of the fungal community in the alfalfa rhizosphere than in the ryegrass rhizosphere. Although the percentage of Gram-negative PAH-degrading bacteria and PAH dissipation were higher in the alfalfa than in the ryegrass rhizotron, no spatial structuring was observed with depth. The variogram fitting of the percentage of Gram-positive PAH-degrading bacteria in the ryegrass rhizosphere would have led to a parabola (exponent 2), which is an ineligible model. For this variable with such a degree of non-stationarity, fitting was performed within the more general model of an intrinsic random function of order one. The variogram was replaced by generalized, indirectly fitted covariance. Kriging of data at T₃₇ confirmed the positive depth gradient of the percentage of Gram-positive PAH-degrading bacteria in the ryegrass rhizosphere.

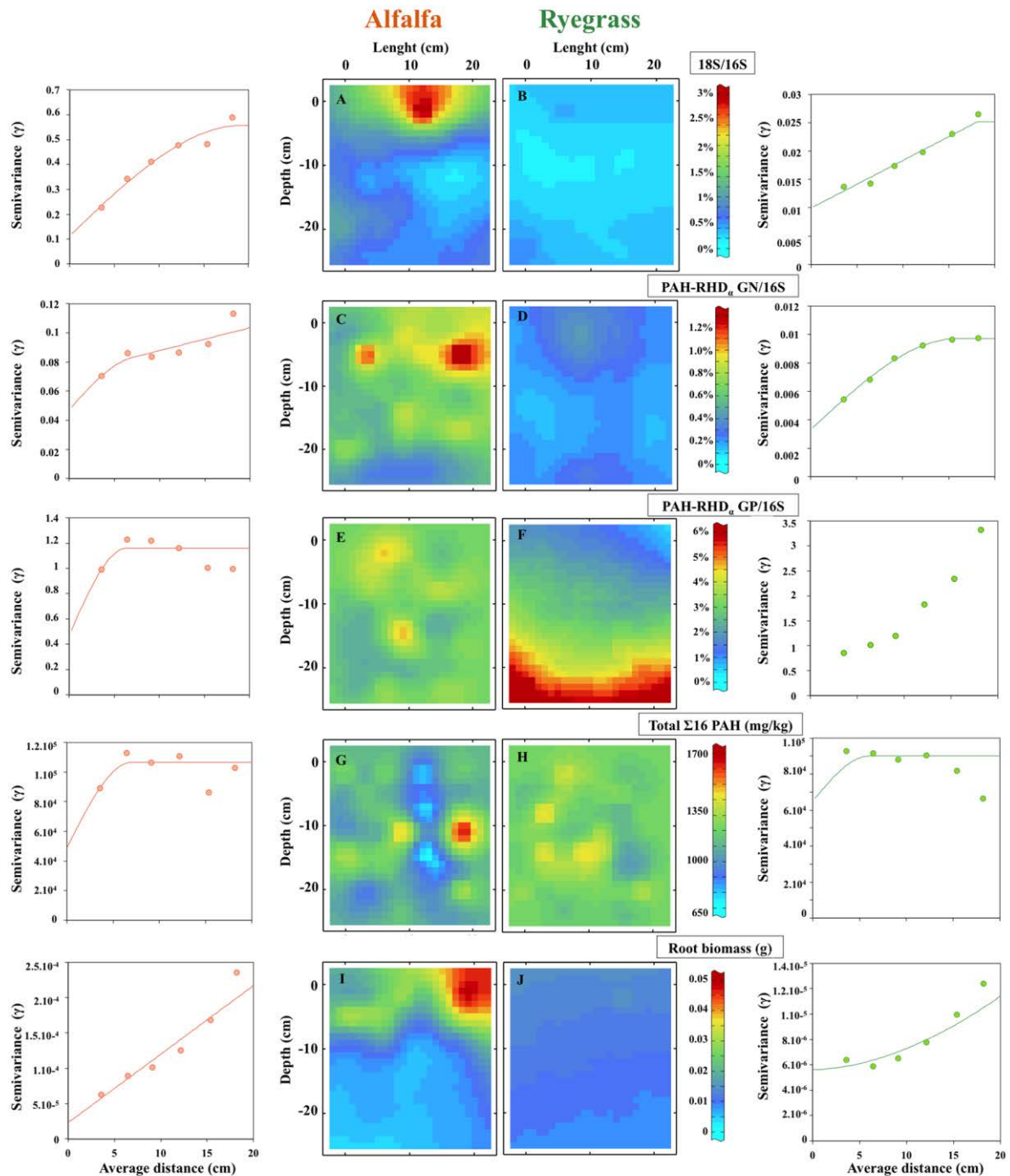


Figure 3.6. Semivariograms and kriging maps modeling the spatial distribution of 5 different parameters measured from the alfalfa (left) and ryegrass (right) rhizotrons. Data after 37 days for: (A and B) fungal communities (percentages of 18S rRNA genes relative to 16S rRNA genes), (C to F) PAH-degrading bacterial communities (percentages of PAH-RHD_α GN and PAH-RHD_α GP genes relative to 16S rRNA genes), (G and H) sum of 16 (US-EPA) PAHs, and (I and J) root biomass. Samples (circles) and fitted semivariograms (lines) are shown. Semivariance was plotted versus distances between samples, and for each parameter different models were used to fit the data (spherical model with nugget effect: alfalfa: sum of 16 PAHs, 18S/16S, PAH-RHD_α GP/16S; ryegrass: sum of 16 PAHs, PAH-RHD_α GN/16S; spherical model, order-1 G.C., with nugget effect: alfalfa: PAH-RHD_α GN/16S; order-1 G.C model with nugget effect: ryegrass: 18S/16S; power model with nugget effect: ryegrass: root biomass; linear model with nugget effect: alfalfa: root biomass. A sample variogram corresponding to PAH-RHD_α GP/16S data was fitted with the more general model of intrinsic random first order function. No model fitted the sample variogram for this variable. Contour maps (10 mm mesh) derived from values interpolated by punctual kriging of 56 samples. (N/A: non-available data).

3.5 Discussion

3.5.1 Spatial gradients in the rhizosphere

After 37 days, root development had induced a spatial heterogeneity in the biomass and age of roots depending on depth, for both ryegrass and alfalfa. Although root biomass was greater at shallow depth in both rhizotrons, the root gradient was more contrasted with alfalfa, probably due to plant species-dependent root system structures. Root growth induced both physical and chemical gradients across the rhizotrons that shaped the microbial community, but not much the PAH-degrading activity.

Soil humidity, a parameter linked to plant development that could influence microbial rhizospheric activity and potentially organic contaminant degradation, did not change significantly with rhizotron depth and was not sufficient to explain depth structuring. The pH was more acidic at shallow depths, where roots were more abundant, as previously shown (Hinsinger et al. 2003). The pH can have an influence on bacterial community composition (Rousk et al. 2010). Moreover, root exudate composition differed with depth, especially sugar concentrations. Although gradients for the different measured sugars were observed in both directions, we can't exclude that root exudate leaching, due to rhizotron watering, can participate to depth gradients. Spatial gradient of exudate quality was probably linked to the developmental stage of the plant roots (Walker et al. 2003; Yang and Crowley 2000) that was different between the shallow and deep parts. Exploratory analysis to study the relationship between different parameters for a same sampling point showed that the percentage of fungi to bacteria was negatively correlated with depth in the alfalfa rhizotron, whereas the percentage of Gram-positive PAH-degrading bacteria was positively correlated with depth in the ryegrass rhizotron. Geostatistical modeling confirmed these trends and evidenced spatial variation of these two parameters with depth. As no strong correlation was shown between these parameters and root biomass, the measurement of root length and/or root surface could provide in future studies further details about the impact of root development. The plant-specific gradient induced by 37 days of root growth led to a significant shift in microbial community abundance and structure, as shown during the development of other plant species (Baudoin et al. 2002; Broeckling et al. 2008; Haichar et al. 2008). Moreover, parameter variability in the rhizosphere, linked to root structure, can impact the microbial community by creating ecological microenvironments at a fine scale (Vos et al. 2013).

Despite the presence of a root biomass gradient, total PAH concentrations were not spatially auto-correlated and presented a nugget effect suggesting that, after 37 days of plant development (T_{37}), roots did not impact noticeably PAH degradation and consequently PAH content at centimeter-scale. Yet, the PAH content variability was greater in alfalfa than in ryegrass rhizosphere, suggesting an impact depending on plant species. This unstructured distribution commonly occurs in PAH-contaminated soil from the meter (Bengtsson et al. 2010) to the centimeter-scale (Hybholt et al. 2011). Several studies suggest that this kind of heterogeneous contaminated environment impacts microbial community distribution and activity. For instance, a geostatistical analysis at the centimeter scale showed that metal hotspots corresponded to low bacterial activity in a heavy-metal-contaminated soil (Becker et al. 2006). On the contrary, characterization of spatial variability of microbial community structure in an aged creosote site showed that PAH hotspots corresponded to higher microbial biomass (Törneman et al. 2008) and respiration rates (Mukherjee et al. 2014). Moreover these authors showed impact of PAH heterogeneity on bacterial community structure with increase of *Proteobacteria* and decrease of *Actinobacteria* abundances in PAH hotspots, suggesting modification in PAH-degrading communities. Other studies indicate that high concentration and hotspots of PAH and petroleum hydrocarbon contamination increased the abundance of PAH-degrading genes (Oliveira et al. 2014a; Siciliano et al. 2003; Bengtsson et al. 2013). In our study, centimeter-scale mapping revealed the presence of hotspots of PAH-degrading bacteria and of PAH content, but there was no obvious correlation between these two parameters. Similar results were obtained by Johnsen et al. (2014), in a polluted roadside soil at the millimeter- to centimeter-scale. The lack of correlation could be explained by the thorough degradation of the spiked PAH fraction after 37 days, when mapping was performed.

3.5.2 Comparison of PAH concentrations and microbial abundance in two contrasted rhizospheres

In aged contaminated soils, bioavailability is one of the most important parameters that limits PAH biodegradation (Allard et al. 2000). Soil preparation by adding a soil organic extract increased total and bioavailability fractions by 20 and 34% respectively, while keeping the historical contaminants and the adapted microbial community (Cébron et al. 2013). The incubation of this contaminated soil in the presence of two different plants in a rhizotron device for 37 days under controlled conditions (humidity, temperature and light) showed a significant dissipation of PAHs as compared to the beginning of the assay. The decrease in

PAH bioavailability within 37 days in both the alfalfa and ryegrass rhizotrons and the degradation rate suggested that PAH dissipation corresponded to all of the spiked and bioavailable fractions. After 37 days of incubation, PAH concentrations in the two rhizotrons were close but lower in alfalfa. Since no rhizotron without plant was included in our study, we cannot conclude that dissipation of PAHs was due to the plants. However, we observed that dissipation of total PAHs and of some high-molecular-weight compounds was significantly higher in the alfalfa than in the ryegrass rhizotron, based on analysis of the 56 samples per rhizotron. The relatively long duration of the experiment probably smoothed out the differences in PAH dissipation rates occurring during the first days or weeks, and maybe obliterated different responses of the two plant species. A supplementary kinetic approach could be interesting to set up the time-course of PAH dissipation and changes in bacterial communities. PAH dissipation can be explained by modifications in the microbial community structure and abundance, namely by an increase in the abundance of both Gram-positive and Gram-negative PAH-degraders during the 37 days of incubation, as compared to the beginning of the assay. This increase occurred in the two rhizotrons, whatever the plant species, as root exudates were shown to favor PAH-degrading bacteria in contaminated soils (Siciliano et al. 2003; Cébron et al. 2009; Storey et al. 2014; Khan et al. 2009).

The devices were considered as homogeneous in PAH content at the centimeter scale at the beginning of the assay, even if hotspots due mainly to tar balls present from the aged-PAH contamination were observed (variability of PAH content values at T_0 estimated on 30 independent sample measurement). Heterogeneity in PAH content due to spiking should appear at a finer scale (grain scale, mm) and was not observed at the cm-scale since spiking did not increase the variability of PAH measurement compared to the initial soil. Moreover, comparison of variances between T_0 and T_{37} PAH values showed that alfalfa had an effect on PAH content variability, while ryegrass did not. Although we can not exclude that a similar phenomenon could have occurred without plant, a higher variability of PAH concentration at T_{37} than at T_0 highlights an effect of alfalfa roots on PAH dissipation efficiency, as alfalfa accentuated the pollutant hot- and cold-spots. The difference between the two plants could be explained by specific and contrasted root structures. Alfalfa possesses a taproot system composed of a central root with emerging roots (Aprill and Sims 1990), while ryegrass is characterized by a highly branched and fibrous root system with many fine roots that impact differently the root-soil interface (Soleimani et al. 2010). The differences between the two plants concerning dissolved organic carbon and sugar contents confirmed that root exudate

composition is plant-specific as previously shown during a 6-week-long rhizotron experiment for free sugars and amino acids (Hertenberger et al. 2002). Root exudate quality provides a soluble and easily degradable carbon source to the soil, so it impacts microbial population abundance.

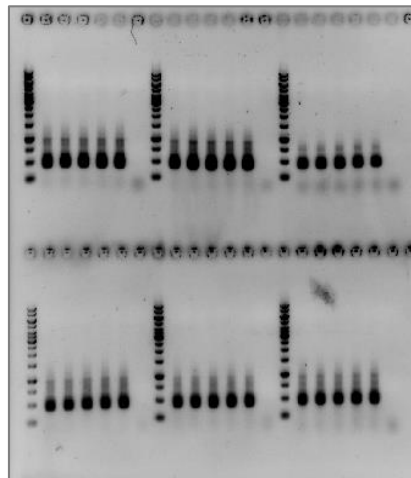
3.6 Conclusion

Using two plants with contrasted root structures commonly used in phytoremediation trials, we showed that the whole spiked PAH fraction was dissipated after 37 days in a controlled rhizotron experiment. Such dissipation was associated with microbial community modification, namely the percentage of PAH-degrading bacteria increased over time. We used geostatistics to describe and quantify the soil spatial structure. Kriging mapping yielded a rational basis for comparing the two rhizospheres. It evidenced a root-dependent physical, chemical and biological spatial gradient. The percentages of Gram-positive PAH-degrading bacteria and of fungi were spatially auto-correlated in the alfalfa and ryegrass rhizotrons, respectively, and presented depth gradients. Although PAH concentrations exhibited a nugget effect, we recorded contrasting effects of plant species on PAH degradation that might be due to differences in microbial activity or diversity. These parameters should be further investigated to evaluate the impact of rhizosphere gradients on microbial diversity and activity over time in order to estimate their temporal variability.

3.7 Acknowledgments

This study was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-JSV7-0007_01). The authors thank the GISFI (www.gisfi.fr) for soil providing, David Billet, Florence Coste and Geneviève Magnin and interns Maximilien Jeanvoine and Paul Dessaint for technical assistance. Carbohydrate analyses were performed by Jacqueline Marchand belonging to the PTEF facility that is supported by the French national Research Agency through the laboratory of Excellence ARBRE (ANR-11-LABX-0002-01). The authors also thank Annie Buchwalter for editing English language.

Chapitre 4 :
Etude de la variabilité spatiale de la
diversité bactérienne dans la rhizosphère
d'un sol multi-contaminé



Au cours du chapitre précédent, nous avons montré que dans la rhizosphère des deux espèces végétales testées, la totalité des HAP disponibles avait été dégradée et l'abondance des bactéries capables de dégrader les HAP avait augmenté après 37 jours de croissance racinaire. Ainsi les gradients racinaires qui se sont créés avec la profondeur au cours du développement des deux espèces végétales ont modifié les abondances des communautés microbiennes. Nous nous sommes donc demandées quel était l'impact de ces gradients rhizosphériques sur la diversité bactérienne.

Ce chapitre présente l'étude de la variabilité spatiale de la diversité bactérienne à l'échelle du système racinaire (cm) des deux espèces végétales (luzerne et ray-grass) cultivées dans le cadre de la première étude en rhizotron. Afin d'étudier la diversité bactérienne, un séquençage haut débit des ADNr 16S a été réalisé sur 16 échantillons par rhizotron.

Au cours de cette étude, nous avons montré que la croissance végétale induisait une modification de la diversité bactérienne, en comparaison avec le sol initial (T0), avec notamment une augmentation de l'abondance relative des phyla *Actinobacteria*, *Alpha* et *Betaproteobacteria*. Au cours des 37 jours de croissance des plantes, des genres bactériens connus pour être impliqués dans la biodégradation des HAP et d'autres genres bénéfiques pour les végétaux ont été favorisés. De plus nous avons observé une sélection de la communauté bactérienne spécifique de l'espèce végétale, ainsi au niveau phylum la croissance racinaire de la luzerne favoriserait davantage les *Bacteroidetes*, les *Firmicutes* et les *Gammaproteobacteria* tandis que le ray-grass sélectionnerait les *Chloroflexi*, les *Alpha* et *Betaproteobacteria*. Un gradient spatial n'a été observé qu'au sein du rhizotron planté avec la luzerne, où la diversité et la richesse bactérienne augmentaient avec la profondeur, et où la biomasse racinaire et la concentration en inositol étaient plus faibles et le pH plus élevé. De plus au niveau phylum, les *Actinobacteria* étaient favorisées en surface contrairement aux *Gemmatimonadetes* et aux *Proteobacteria*, plus abondantes en profondeur.

Ces travaux font l'objet d'une publication soumise, référencée dans la suite du manuscrit par Bourceret et al. Submitted.

4. Plant species with contrasted rhizosphere gradients induce different shifts in multi-contaminated soil bacterial diversity

Amélia Bourceret^{1,2}, Corinne Leyval^{1,2}, François Thomas^{1,2}, Aurélie Cébron^{1,2,*}

¹ CNRS, LIEC UMR7360, Faculté des Sciences et Technologies, Bd des Aiguillettes, BP70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

² Université de Lorraine, LIEC UMR7360, Faculté des Sciences et Technologies, Bd des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

*Corresponding author: aurelie.cebron@univ-lorraine.fr; phone: (+33) 383684296.

Key words: Alfalfa, ryegrass, pyrosequencing, bacterial diversity, contaminated soil, rhizotron

4.1 Abstract

In industrial soils, plants can help to dissipate polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination by enhancing microorganism activity and selecting an adapted microbial community. However, phytoremediation efficiency is linked to plant species and stage of plant development that impacts specifically root exudates quality and thus the microbial diversity in the rhizosphere. We hypothesized that root density and chemical gradients (pH, carbohydrates), previously observed in a spatial variability study of alfalfa and ryegrass rhizosphere in two independent rhizotrons, would structure bacterial diversity. A 37 days controlled incubation of an aged PAH-contaminated soil in rhizotrons with the two plants showed significant modification in the bacterial diversity with the relative increase in *Actinobacteria*, *Alpha-* and *Beta-Proteobacteria* abundance, favored known PAH-degrading species and plant beneficial bacteria, compared to the initial spiked soil. Comparison of the two contrasted rhizospheres confirmed the impact of plant species on bacterial diversity. Indeed *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Gammaproteobacteria* were favored in alfalfa while *Chloroflexi*, *Alpha-* and *Beta-Proteobacteria* increased in ryegrass rhizosphere. In alfalfa, bacterial diversity, richness and evenness were negatively correlated with the root biomass gradient and inositol content and positively correlated with the pH whereas no correlation was observed for ryegrass for which bacterial diversity was similar throughout the rhizosphere.

4.2 Introduction

Anthropogenic activities result in large areas of polluted soils. More particularly industrial activities linked to coal mining lead to polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and heavy metal (HM) contamination. PAH organic pollution is persistent in the environment due to a low availability, degradability and a high hydrophobicity. Globally the impact of organic contamination on *in situ* microbial diversity is poorly described, but few laboratory experiments studied consequences of PAH spiking on soil diversity. For instance Yang et al. (2014a) showed that hydrocarbon pollution induced shifts in bacterial community composition and decreased the diversity. Similar results were observed in an aged creosote-contaminated site indicating that spatial hotspot of pollution increased abundance of *Proteobacteria* contrary to *Actinobacteria*, *TM7* and *Planctomycetes* phyla (Mukherjee et al. 2014). PAH contamination also selects populations especially adapted for degradation. Indeed Zhang et al. (2013b) showed that PAH contamination increased the abundance of PAHs-related microbial functional genes, such as *nidA* encoding dioxygenase implicated in the first steps of the degradation pathway.

Rhizoremediation strategies can increase PAH degradation by stimulating microorganisms in the rhizosphere (Kuiper et al. 2004). Indeed root development can stimulate microbial population *via* exudation of labile carbon sources, and enhance PAH bioavailability due to surfactant compounds (Sun et al. 2013). Rhizosphere root exudates could trigger microbial competition for carbon source, select specific microbes and decrease microbial diversity (Kowalchuk et al. 2002). The few studies on contaminated soil showed that plants induce a shift in microbial community structure and favor some taxa (Cébron et al. 2009; Bourceret et al. 2015) including PAH-degraders (Cébron et al. 2009; Storey et al. 2014). On the other hand, PAH biodegradation could be variable in the rhizosphere depending on spatial heterogeneity (Corgié et al. 2003). In fact spatio-temporal physical and chemical gradients linked to root growth were observed in the rhizosphere, notably for pH and root exudates composition and concentration (Hinsinger et al. 2003; Walker et al. 2003). Thus these gradients, depending on root location and stage of plant development, can impact microbial population (Baudoin et al. 2001; Baudoin et al. 2002; Corgié et al. 2006), and potentially the one involved in PAH biodegradation.

The effect of plants on PAH biodegradation depends on the species. For instance D’Orazio et al. (2013) showed in a pot experiment that *Medicago sativa* was the most effective among the three tested plants for the remediation of a pyrene-spiked soil. Another study focusing on phytoremediation of an aged-contaminated soil showed difference in PAH dissipation between the 18 plant species tested, belonging to 8 plant families. The authors concluded that grasses and perennial ryegrass were the most effective plant family and species, respectively (Olson et al. 2007). These results can be explained by species-specific root morphology and exudates quality (Hertenberger et al. 2002) that drive microbial colonization in the rhizosphere (Marschner et al. 2001). Indeed plants releasing different root exudates can have contrasted effects on the microbial community structure (Haichar et al. 2008; Broeckling et al. 2008) even in hydrocarbon-contaminated soil (Kirk et al. 2005).

On two independent rhizotrons designed to study the impact of centimeter-scale spatial variability of alfalfa and ryegrass rhizosphere on the fate of PAH, we previously evidenced a significant effect of plant species on PAH dissipation (Bourceret et al. in Press). Comparison of the two rhizotrons after 37 days of plant growth showed physical and chemical spatial gradients of root biomass, pH and carbohydrate contents. The relative abundance of the functional population of PAH degraders increased in both rhizotrons but presented two different distributions along the depth root gradients (Bourceret et al. in Press).

We hypothesized that PAH biodegradation previously observed was linked to a shift in bacterial community, probably induced by incubation conditions (i.e. plant growth, constant humidity and temperature) that might participate to the selection of PAH degraders. Moreover potential contrasts between bacterial communities associated with alfalfa and ryegrass rhizospheres could explain the effect of plant species on PAH biodegradation. The two plant species have contrasted root structure creating rhizospheric gradients with depth that potentially modify differently the bacterial diversity in a multi-contaminated soil. To test these hypotheses, we used tag-encoded amplicon pyrosequencing of bacterial 16S rRNA genes to examine bacterial community structure and composition in selected samples from the previously described rhizotron experiments (Bourceret et al. in Press).

4.3 Materials and methods

4.3.1 Experimental device and sampling

Soil collected from a former coking plant site (Neuves-Maisons [NM], Lorraine, France) was used for a rhizotron laboratory experiment as described in Bourceret et al. (in Press). This previously studied aged-contaminated soil features both PAH and heavy metal contaminations (Cébron et al. 2009; Ouvrard et al. 2011). To increase the bioavailable PAH fraction, the NM soil was spiked with a complex organic pollutant extract containing PAHs (Cébron et al. 2013). Briefly, the experimental rhizotron device was a poly-methyl-methacrylate box (H: 30 cm x D: 30 cm x W: 2.5 cm) with a removable front face, and holes (0.4 cm in diameter) at the bottom to allow water flow. Two rhizotrons were filled with NM spiked soil and watered to 80% Water Retention Capacity (WRC). Three sub-samples of NM spiked soil were collected from each device immediately after set-up (T0) and stored at -80°C until analysis. Rhizotrons were used to compare two plant species with contrasted root systems. Alfalfa (*Medicago sativa* var. Europe) and ryegrass (*Lolium multiflorum* var. Podium) were grown in regulated growth chamber in independent rhizotrons as described in Bourceret et al. (in Press). After 37 days (T37), soil cores were sampled every 6 cm at 2, 8, 14 and 20-cm depth (four cores per depth, 1.6 cm in diameter). For each sample, roots were immediately separated from the adherent rhizospheric soil by rinsing with sterile water. Rhizospheric soil was recovered by centrifugation and pooled to bulk soil to obtain one mixed soil sample per core. The 32 mixed soil samples were stored at -80°C until analysis. Rinsed roots were dried at 60°C and weighed to estimate the root biomass in each sample.

4.3.2 Soil characteristics

Biological parameter, i.e. bacterial abundance (16S rRNA gene quantification using Real-Time PCR, (Cébron et al. 2008) and environmental parameters, i.e. total and bioavailable PAHs, dissolved organic carbon (DOC), root biomass, mass of rhizospheric soil, pH and carbohydrate (inositol, mannitol, sucrose, glucose, xylose and fructose) concentrations were previously measured by Bourceret et al. (in Press) from the same soil samples (**Annexe 4.1**).

4.3.3 DNA Extraction

From ca. 0.5 g wet weight of the 38 soil samples (6 samples from alfalfa and ryegrass rhizotrons at the beginning of the experiment (T0) and 16 samples corresponding to 4 samples at 4 depths for each plant after 37 days of growth (T37_alf and T37_rye)), total genomic DNA (gDNA) was extracted using the FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Illkirch,

France) and resuspended in 100 µl of DES (Dnase-free water). A spectrophotometer (UV1800, Shimadzu) equipped with a TrayCell unit (Hellma) allowed measuring gDNA concentration and evaluating its quality (purity ratio A_{260}/A_{280}).

4.3.4 PCR and pyrosequencing

The V4-V5 region of bacterial 16S rDNA was amplified using the primer set 515F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3') / 907R (5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3') (Turner et al. 1999), combined at the 5'-end with a MID (Multiplex IDentifier, Roche) corresponding to a sample identification sequence of 10 nucleotides. PCR reactions were performed for each sample in five replicates, in a final volume of 50 µl containing 5X Taq-&Go™ ready to use PCR Mix (MP Biomedicals, Illkirch, France), 10 pM of each primer, and 2 µl of ten-fold diluted template gDNA. Amplicons from the five independent reactions were pooled and purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, France). Amplicon concentration was measured on a spectrophotometer (UV1800, Shimadzu) equipped with a TrayCell unit (Hellma). An equimolar mix of the thirty-eight 16S rDNA amplicons was prepared in a final volume of 50 µl, reaching a total concentration of 40 ng.µl⁻¹. Finally, amplicons were sequenced by Beckman Coulter Genomics (Danvers, MA, USA) using a 454/Roche GS-FLX Titanium system. All sequence data have been deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) and are available under the BioProject ID: X.

4.3.5 Analysis of 16S rDNA sequences

After a denoising step from fasta- and qual-files with Acacia 1.52-b0 program (Bragg et al. 2012) at the default parameters, a total of 565,240 16S rDNA sequences were retained. Denoised data were further analyzed in the QIIME1.8.0 pipeline (Caporaso et al. 2010). First, sequences were distributed to the 38 samples according to their MIDs and filtered according to different criteria: a length between 300 and 500 bp, a minimum average quality score allowed in sequence of 25, an absence of ambiguous bases and a maximum length of homopolymer runs of 6 bp. The sequences of both primers were used to identify non-sense sequences and to reverse complement them to include these data in the analysis. Second, sequences were clustered in Operational Taxonomic Units (OTUs) at 97% of similarity using USEARCH program including chimera detection (Edgar 2010). Taxonomy was assigned to a representative sequence from each OTU, identified as the most abundant read, using RDP classifier (Wang et al. 2007) and the Greengenes 13_5 database (McDonald et al. 2012). Finally, subsampling was performed to 3223 sequences per sample, corresponding to the

lowest number of sequences retrieved in one of the samples. Rarefaction curves and Venn diagrams were drawn and alpha-diversity indexes (richness and diversity estimates) were calculated from this data set using QIIME1.8.0 pipeline. Venn diagrams, representing the number of shared OTUs between T0, T37_alf and T37_rye conditions, were drawn by gathering replicates samples per condition (T0: n=6, T37_alf: n=16, T37_rye: n=16). Sorensen indexes ($\beta = 2C/(S1+S2)$ where C: number of shared OTUs, S1: number of total OTUs in the first bacterial community, S2: number of total OTUs in the second bacterial community) were calculated based on gathered data per condition, comparing conditions in pairs.

4.3.6 Statistical analysis

Differences in alpha-diversity estimates between groups were tested using Student t-test and one-way ANOVA in XLstat software version 2.01 (Addinsoft) with significance level set at $p < 0.05$. Differences in the relative abundance of taxa composing the bacterial community, over time and depending on plant species, were analyzed with STAMP version 2.0.8 (Parks and Beiko 2010) that allowed considering the effect size to evaluate the magnitude of the observed differences. Welch's t-tests with filtering of the results based on effect size (difference between proportions > 1 or ratio of proportions > 4) were used to evaluate changes in relative abundance between groups: (i) between 0 and 37 days, independently for alfalfa or ryegrass conditions, and (ii) between the two plant conditions after 37 days. Discriminant taxa between the four studied depths (2; 8; 14; 20 cm) after 37 days, inside alfalfa or ryegrass condition were identified using a Tukey-Kramer ANOVA with filtering of the results based on effect size $\eta^2 > 0.26$, that is considered as a large value (Nakagawa and Cuthill 2007). For Welch's tests and ANOVA performed in STAMP, significance level was set at $q = 0.05$ after Benjamini-Hochberg correction for multiple testing, and only taxa with relative abundance representing at least 3 sequences in one sample were considered. Finally, non-metric multidimensional scaling (nMDS) was performed in R (version 3.0.1) on a Bray-Curtis dissimilarity matrix by using pyrosequencing data at the OTU level for the two-plant species conditions after 37 days. Fitting of the soil characteristics was performed using the envfit function from the vegan package (Oksanen et al. 2013). After calculation of Pearson correlation between studied parameters and bacterial diversity, only significant factors ($p < 0.05$) were conserved for visualization.

4.4 Results

After quality-filtering and subsampling, a total of 122,474 16S rDNA sequences were clustered in 2,149 OTUs belonging to 18 phyla represented by more than 3 sequences. By gathering the ten most abundant OTUs per condition, we found that the bacterial community was dominated by 21 OTUs, of which one-third belongs to *Proteobacteria*. These 21 OTUs accounted for $42.5 \pm 2.4\%$ of the bacterial 16S rDNA sequences. At T0, bacterial community was dominated by OTU2 affiliated to unclassified *Xanthomonadaceae* (*Gammaproteobacteria*). After 37 days the bacterial communities in alfalfa and ryegrass rhizosphere were respectively dominated by OTU4 affiliated to *Pseudomonas* genus (*Gammaproteobacteria*) and OTU0 affiliated to *Thiobacillus* genus (*Betaproteobacteria*).

4.4.1 Modification of bacterial community over time

We first assessed how bacterial community structure and composition changed in vegetated rhizotrons over the 37-days growth period. Bacterial richness, estimated from the number of observed OTUs and using the Chao1 estimator, decreased significantly ($p=0.0002$, $p=0.001$ and $p<0.001$, $p=0.007$) over time for alfalfa and ryegrass rhizotrons, respectively (**Table 4.1**, "Time effect").

Bacterial diversity, estimated using the inverse of Simpson's index, and the taxon evenness were significantly ($p=0.012$, $p=0.013$) greater after 37 days compared to T0 for the soil of ryegrass rhizotron, while staying constant for the soil of alfalfa rhizotron. At T0, similar communities were found in both rhizotrons (**Figure 4.1**), mainly composed of *Proteobacteria* (ca. 50%), *Actinobacteria* (ca. 15%), *Planctomycetes* and *Chloroflexi* (each between 6.5 and 9%), *Nitrospirae*, *Gemmatimonadetes* and *Bacteroidetes* (each between 4 and 6%). *Proteobacteria* were dominated by *Gammaproteobacteria* (ca. 25%), *Alphaproteobacteria* (ca. 16%) and *Betaproteobacteria* (ca. 5%). This community structure was markedly affected after 37 days in the presence of plants (**Figure 4.1**). Irrespective of the plant species, some taxa were significantly favored (*Actinobacteria*, *Alpha-* and *Betaproteobacteria*) or repressed (*Chloroflexi* and *Deltaproteobacteria*) over time. In addition, specifically for alfalfa condition, relative contributions of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* significantly increased after 37 days while *Gemmatimonadetes* and *Nitrospirae* were significantly repressed.

Table 4.1. Bacterial richness and diversity estimators in soil planted with alfalfa (Alf) or ryegrass (Rye) before (T0) and after 37 days (T37) of growth, at four depths (2, 8, 14 and 20 cm from the surface of the rhizotron). OTUs were created with 97% sequence similarity (OTU₉₇). Means \pm SD, n=3 (T0 samples) and 4 (T37 samples). The effects of time and plant species were evaluated using Student t-tests (p<0.05). The effect of depth was tested (different letters (a, b, c) denote groups with significantly different values (p<0.05)) separately for each plant species at 37 days using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparison test.

Soil characteristics				Richness estimator		Diversity estimator		
Conditions	Plant	Time (Days)	Depth (cm)	Observed OTU ₉₇	Chao1	Shannon's index (H')	Inverse of Simpson's index (1/D)	Evenness (E)
Alf_T0	Alfalfa	0	-	467 \pm 14	839 \pm 78	6.79 \pm 0.12	33.15 \pm 5.07	0.766 \pm 0.010
Alf_T37-2	Alfalfa	37	2	351 \pm 7 ^c	519 \pm 33 ^c	6.42 \pm 0.11 ^b	29.78 \pm 4.50 ^b	0.759 \pm 0.012 ^b
Alf_T37-8	Alfalfa	37	8	375 \pm 22 ^{bc}	581 \pm 57 ^{bc}	6.64 \pm 0.27 ^{ab}	42.02 \pm 13.88 ^{ab}	0.777 \pm 0.024 ^{ab}
Alf_T37-14	Alfalfa	37	14	389 \pm 25 ^{ab}	629 \pm 57 ^b	6.70 \pm 0.19 ^{ab}	42.08 \pm 7.47 ^{ab}	0.779 \pm 0.014 ^{ab}
Alf_T37-20	Alfalfa	37	20	415 \pm 15 ^a	723 \pm 52 ^a	6.92 \pm 0.13 ^a	54.10 \pm 10.01 ^a	0.796 \pm 0.013 ^a
Rye_T0	Ryegrass	0	-	475 \pm 11	824 \pm 103	6.89 \pm 0.15	40.56 \pm 9.03	0.775 \pm 0.015
Rye_T37-2	Ryegrass	37	2	415 \pm 10 ^a	684 \pm 76	6.91 \pm 0.14	53.31 \pm 9.44	0.795 \pm 0.017
Rye_T37-8	Ryegrass	37	8	415 \pm 7 ^a	707 \pm 47	6.99 \pm 0.07	60.06 \pm 8.95	0.804 \pm 0.008
Rye_T37-14	Ryegrass	37	14	396 \pm 5 ^b	619 \pm 70	6.85 \pm 0.14	50.65 \pm 8.66	0.793 \pm 0.016
Rye_T37-20	Ryegrass	37	20	434 \pm 14 ^a	722 \pm 39	6.96 \pm 0.08	56.98 \pm 5.11	0.795 \pm 0.007
<i>Student t-tests</i>	Time effect - Alfalfa			T0 > T37	T0 > T37	n.s.	n.s.	n.s.
	Time effect - Ryegrass			T0 > T37	T0 > T37	n.s.	T37 > T0	T37 > T0
	Plant effect (T37)			Rye > Alf	Rye > Alf	Rye > Alf	Rye > Alf	Rye > Alf

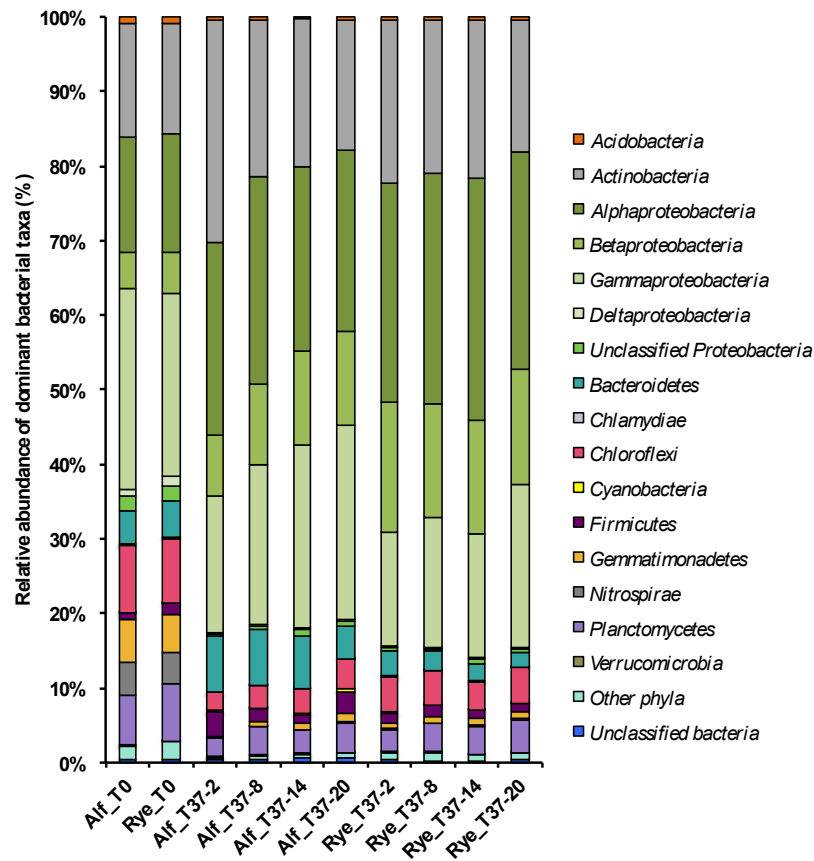


Figure 4.1. Relative abundance of the dominant bacterial phyla (represented by at least 3 sequences) at T0 and after 37 days (T37), for alfalfa (Alf) and ryegrass (Rye) at 4 depths (2, 8, 14 and 20 cm from the surface of soil). Proteobacteria were represented at the class level for better taxonomic resolution. Means \pm SD, n=3 for T0 samples and n=4 for T37 samples. The group named other phyla includes: MVP-21, OD1, SBR1093, TM6, TM7.

We further found a total of 33 OTUs discriminating the time effect, with respectively 21 OTUs for ryegrass and 19 OTUs for alfalfa condition (**Figure 4.2**). Ten OTUs were significantly favored over time irrespective of the plant species. These bacterial OTUs were affiliated to unclassified *Micrococcaceae* (*Actinobacteria*), *Sphingobium* and unclassified *Sphingomonadaceae* (*Alphaproteobacteria*), unclassified *Oxalobacteraceae*, unclassified *Burkholderiales* and *Thiobacillus* (*Betaproteobacteria*), *Pseudomonas*, unclassified PYR10d3, and unclassified *Gammaproteobacteria* (*Gammaproteobacteria*). Furthermore, three OTUs significantly favored only with alfalfa were affiliated to unclassified *Micrococcaceae* (*Actinobacteria*), *Flavobacterium* (*Bacteroidetes*) and *Devosia* (*Alphaproteobacteria*) while 6 OTUs significantly favored only with ryegrass belonged to *Nocardioideaceae* (*Actinobacteria*), *Planctomyces* (*Planctomycetes*), *Devosia*, *Sphingobium* and unclassified *Sphingomonadaceae* (*Alphaproteobacteria*). For both plant species, 2 OTUs were significantly repressed over time. These bacterial OTUs were affiliated to unclassified Gitt-

GS-136 (*Chloroflexi*) and unclassified *Erythrobacteraceae* (*Alphaproteobacteria*). Five OTUs, affiliated to unclassified PAUC26f (*Acidobacteria*), unclassified 0319-7L14 (*Actinobacteria*), unclassified Gemm-1 (*Gemmatimonadetes*), *Nitrospira* (*Nitrospirae*), *Devosia* (*Alphaproteobacteria*) and unclassified *Gammaproteobacteria* and 7 OTUs affiliated to unclassified S085 (*Chloroflexi*), unclassified *Rhodospirillaceae* (*Alphaproteobacteria*), unclassified *Syntrophobacteraceae* (*Deltaproteobacteria*) and unclassified *Piscirickettsiaceae* (*Gammaproteobacteria*) were significantly repressed over time for alfalfa and ryegrass rhizotron, respectively.

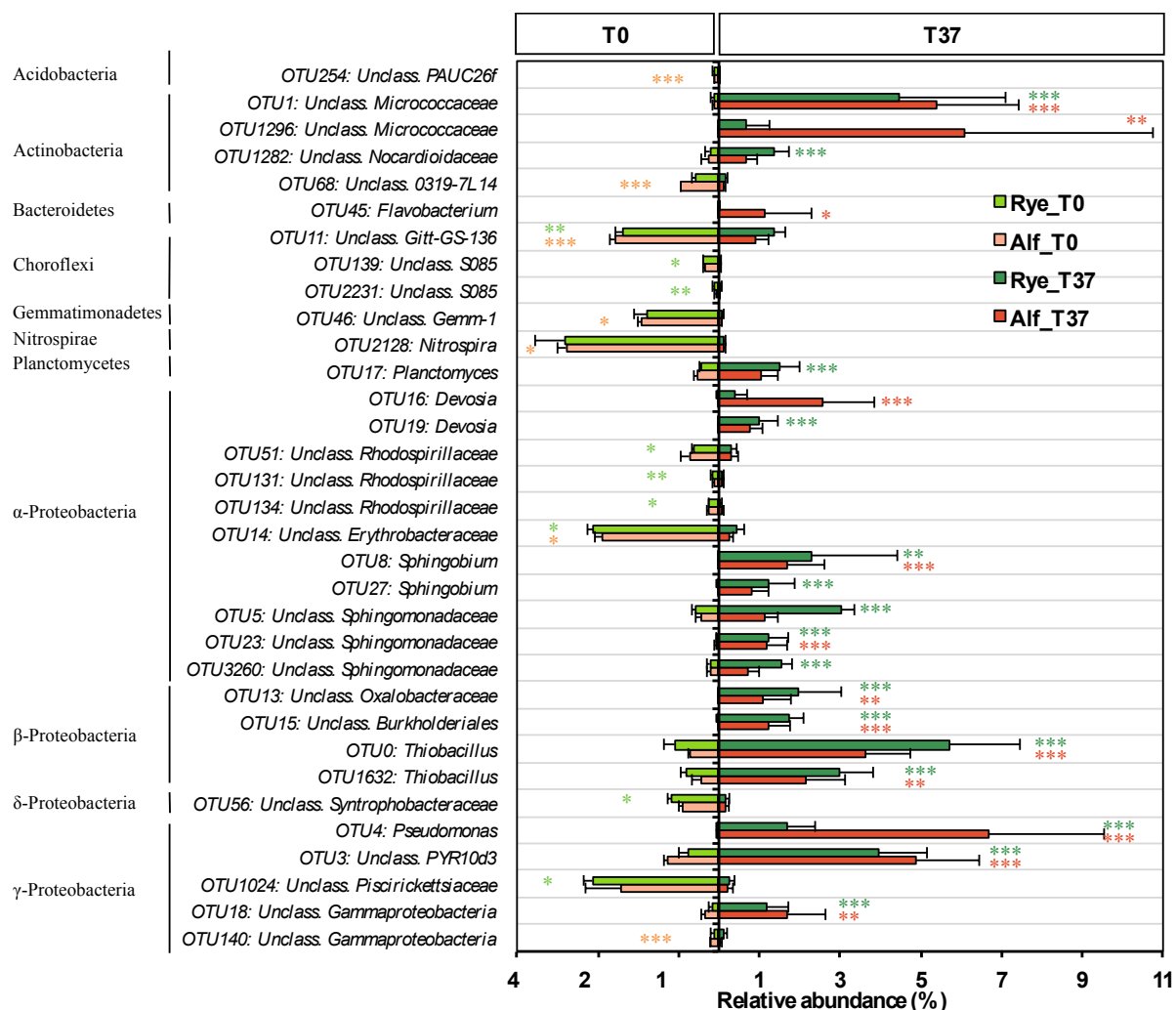


Figure 4.2. OTUs showing significant change in relative abundance between T0 and T37 for each plant. Data were compared using Welch's t-tests with Benjamini-Hochberg correction of p-value (q-value). Differences were considered significant if $q < 0.05$ and filtered for effect size (difference between proportions > 1 or ratio between proportions > 4). Means \pm SD over the entire depth profile ($n=3$ and $n=16$ for T0 and T37, respectively). Values at T0 (left side) were compared to T37 (right side) for each plant and asterisks denote the time with highest relative abundance (green, ryegrass; orange, alfalfa; *, $q < 0.05$; **, $q < 0.01$; ***, $q < 0.001$).

4.4.2 Plant species effect on the bacterial community

We further characterized the effect of different plant species on rhizosphere bacterial communities by comparing results from both rhizotrons at T37. All estimates of bacterial richness ($p=0.017$ and 0.001 for Chao1 and OTU₉₇, respectively), evenness ($p=0.003$) and diversity ($p=0.001$ and 0.005 for H' and 1/D, respectively) were significantly higher in soil planted with ryegrass compared to alfalfa (Table 1, "Plant effect"). At broad taxonomic levels, *Bacteroidetes* (*Flavobacteriia* class and *Flavobacteriales* order), *Firmicutes* (*Bacilli* class and *Bacillales* order) and *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonadales* order) were significantly more abundant in alfalfa than in ryegrass rhizotron (Table 4.2). Reversely, *Chloroflexi*, *Alphaproteobacteria* (*Sphingomonadales* and *Caulobacterales* orders), *Betaproteobacteria* (*Burkholderiales* and *Hydrogenophilales* orders) and *Acidimicrobiia* (*Acidimicrobiales* order, belonging to *Actinobacteria*) were significantly more abundant with ryegrass than with alfalfa (Table 4.2).

Table 4.2. Bacterial taxa showing significant effect of the plant species on relative abundance after 37 days, at the phylum, class and order levels. Mean \pm SD (n=16) over the entire depth profile. The effect of plant was evaluated using Welch's t-tests followed by Benjamini-Hochberg correction of the p-values. Significant taxa were defined based on stringent criteria: abundance (at least 3 sequences in one sample), corrected p-value ($p<0.05$) and effect size (difference between proportions > 1 or ratio of proportions > 4). For each taxon, values in boldface denote the group with highest relative abundance.

Bacterial community		Relative abundance (%)	
		Alf_T37	Rye_T37
Phylum level			
	<i>Bacteroidetes</i>	6.6 \pm 2.5	2.5 \pm 0.8
	<i>Chloroflexi</i>	3.1 \pm 0.8	4.4 \pm 0.6
	<i>Firmicutes</i>	2.3 \pm 1.0	1.3 \pm 0.3
	<i>Proteobacteria</i>	60.1 \pm 5.4	64.7 \pm 4.2
Class level			
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiia</i>	3.0 \pm 1.0	4.5 \pm 0.7
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	3.6 \pm 2.2	0.4 \pm 0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	2.1 \pm 1.0	0.9 \pm 0.2
	<i>Alphaproteobacteria</i>	25.7 \pm 2.0	30.5 \pm 2.5
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	11.0 \pm 2.7	15.9 \pm 3.4
	<i>Gammaproteobacteria</i>	22.6 \pm 4.2	17.7 \pm 3.2
Order level			
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiales</i>	3.0 \pm 1.0	4.5 \pm 0.7
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriales</i>	3.6 \pm 2.2	0.4 \pm 0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillales</i>	2.1 \pm 1.0	0.9 \pm 0.2
	<i>Sphingomonadales</i>	11.6 \pm 1.7	16.0 \pm 2.6
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	1.9 \pm 0.3	3.1 \pm 0.6
	<i>Burkholderiales</i>	4.3 \pm 0.9	6.1 \pm 1.4
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Hydrogenophilales</i>	5.8 \pm 2.0	8.8 \pm 2.2
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	7.4 \pm 2.8	3.1 \pm 1.3

In addition, we found 11 OTUs discriminating plant species effect (**Figure 4.3**). The relative abundance of three OTUs affiliated to *Mycoplana*, unclassified *Sphingomonadaceae* (*Alphaproteobacteria*) and *Thiobacillus* (*Betaproteobacteria*) increased significantly in ryegrass rhizotron. The relative abundance of eight OTUs affiliated to unclassified *Micrococcaceae* (*Actinobacteria*), *Paenibacillus* (*Firmicutes*), unclassified *Caulobacteraceae*, *Devosia*, unclassified *Sphingomonadaceae* (*Alphaproteobacteria*) and *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*) increased significantly in alfalfa rhizotron.

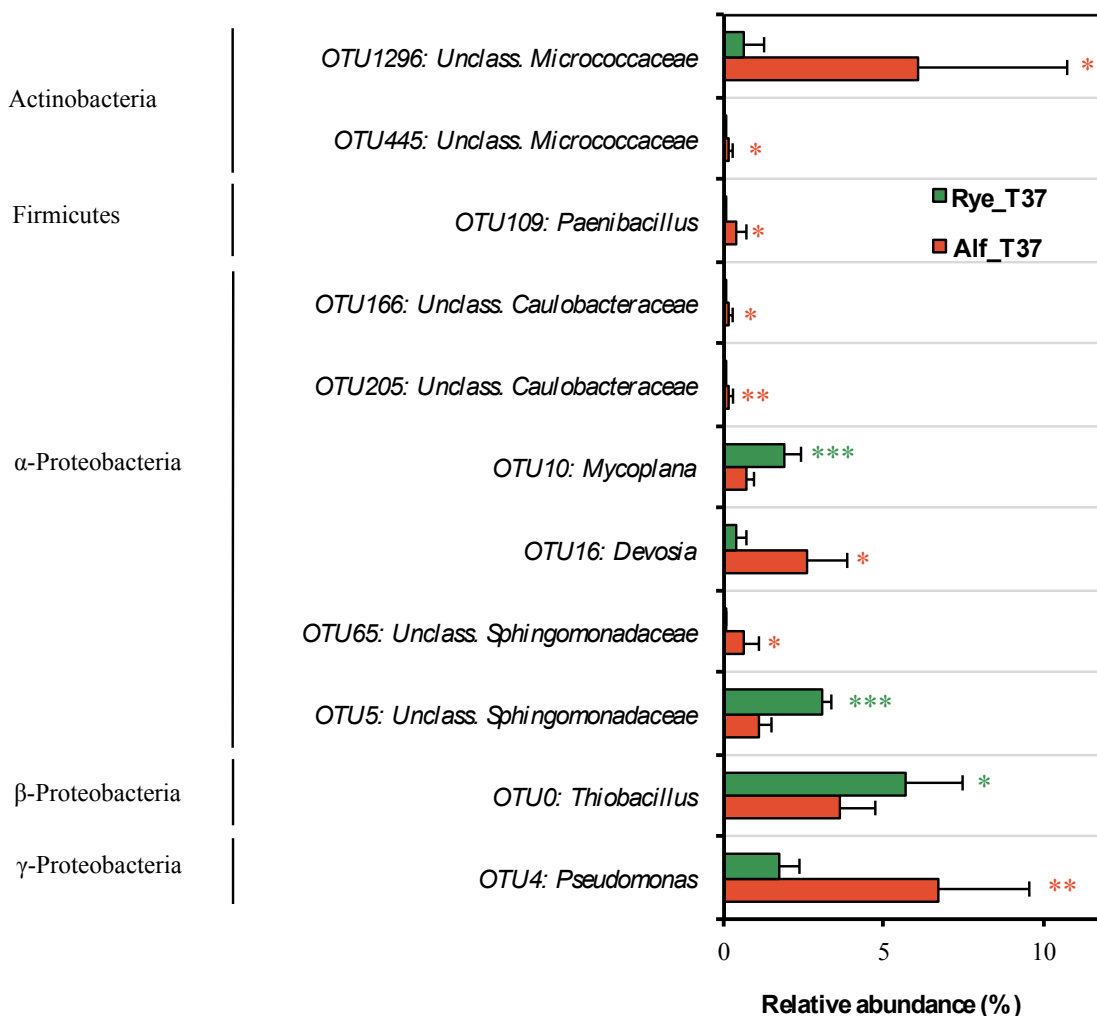


Figure 4.3. OTUs showing significant change in relative abundance between ryegrass and alfalfa at T37. Data were compared using Welch's t-tests with Benjamini-Hochberg correction of p-value (q-value). Differences were considered significant if $q < 0.05$ and filtered for effect size (difference between proportions > 1 or ratio between proportions > 4). Means \pm SD over the entire depth profile ($n=16$). Values at T37 were compared between plant and asterisks denote the plant with highest relative abundance (green, ryegrass; orange; alfalfa; *, $q < 0.05$; **, $q < 0.01$; ***, $q < 0.001$).

4.4.3 Depth structuration of bacterial community after 37 days

No effect of sampling depth could be detected on bacterial richness, diversity and evenness estimators in the ryegrass-planted rhizotron (**Table 4.1**). On the contrary, all estimators increased significantly with depth in the soil planted with alfalfa ($p=0.003$, 0.001 , 0.017 , 0.029 and 0.052 for OTU₉₇, Chao1, H', 1/D and E, respectively). Furthermore, they were negatively correlated to alfalfa root biomass that was more abundant at shallow depth (Pearson's correlation coefficient $R^2 = -0.60$, -0.61 , -0.64 , -0.54 and -0.62 for OTU₉₇, Chao1, H', 1/D and E, respectively). At phylum level, the relative abundance of *Actinobacteria* increased significantly at shallow depth and *Gemmatimonadetes* and *Proteobacteria* phyla were significantly more abundant at greater depth (**Figure 4.1**).

The relative abundance of ten OTUs varied significantly with depth in the soil from the alfalfa rhizotron (**Figure 4.4**). Five OTUs affiliated to unclassified *Micrococcaceae* (*Actinobacteria*), unclassified *Chitinophagaceae* (*Bacteroidetes*), unclassified *Bacillales* (*Firmicutes*), *Planctomyces* (*Planctomycetes*) and unclassified *Methylobacteriaceae* (*Alphaproteobacteria*) were significantly favored at shallow depth. Five OTUs affiliated to unclassified *Nocardioideaceae* (*Actinobacteria*), *Bacillus selenatarsenatis* (*Firmicutes*), unclassified *Phyllobacteriaceae* (*Alphaproteobacteria*) and unclassified *Xanthomonadaceae* (*Gammaproteobacteria*) were significantly favored at greater depth.

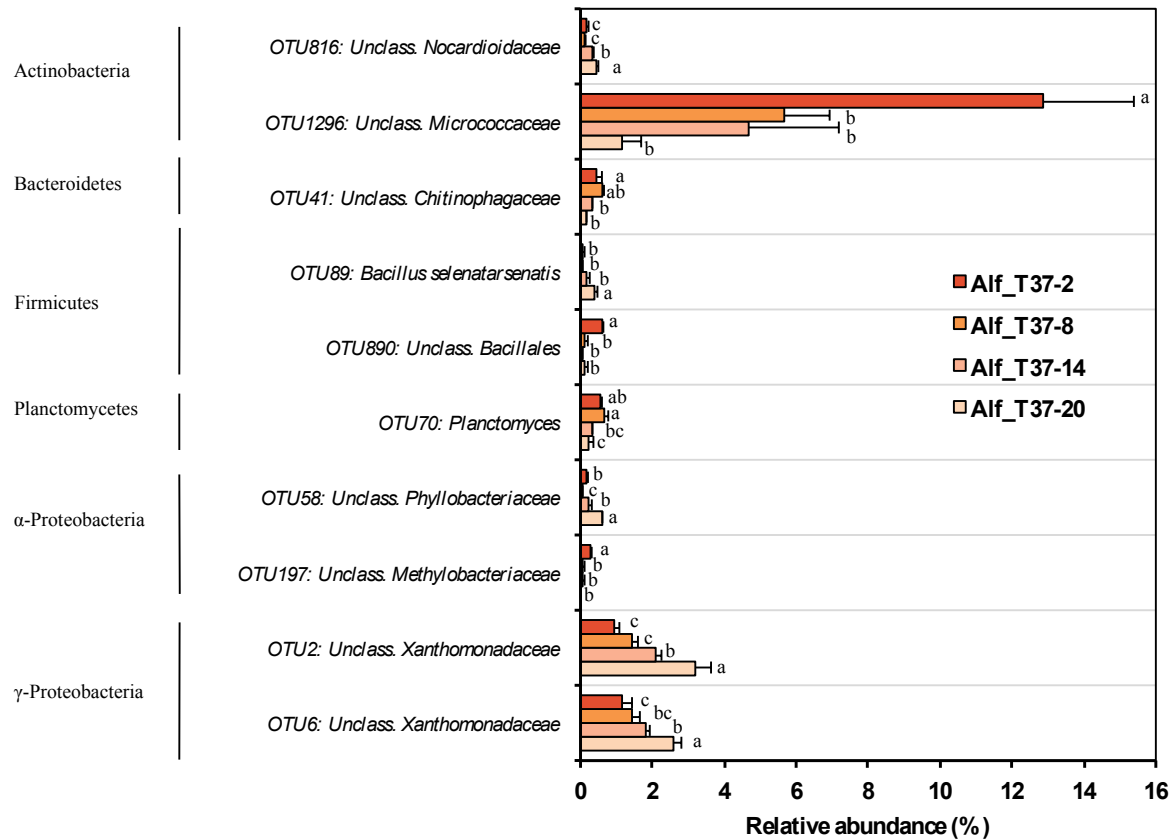


Figure 4.4. OTUs discriminating the four studied depth and showing the spatial variability of the bacterial community in alfalfa condition. A Tukey-Kramer ANOVA with Benjamini-Hochberg correction of p-value (q-value) allowed to identify OTUs with significant (considering $q < 0.05$, and effect size > 0.26) differences in the relative abundance depending on rhizotron depth (-2, -8, -14 and -20 cm from the surface of soil). Means \pm SD (n=4). For each OTU, letters denote groups with significant differences in relative abundance.

4.4.4 Beta diversity

Beta-diversity analysis was performed to link bacterial community structure with edaphic parameters. Venn diagram showed that 606 OTUs, representing 28% of the total bacterial community were shared between the T0, T37_alf and T37_rye conditions (**Figure 4.5**). Moreover the two soils after 37 days of plant growth shared a higher number of OTUs (42%) compared to T0 (32 and 34% of shared OTUs between T0-T37_alf and T0-T37_rye, respectively) (**Figure 4.5**). This trend was confirmed by calculation of Sorensen indexes, ($\beta = 0.66, 0.56$ and 0.58 for T37alf/T37rye, T0/T37alf and T0/T37rye comparisons, respectively).

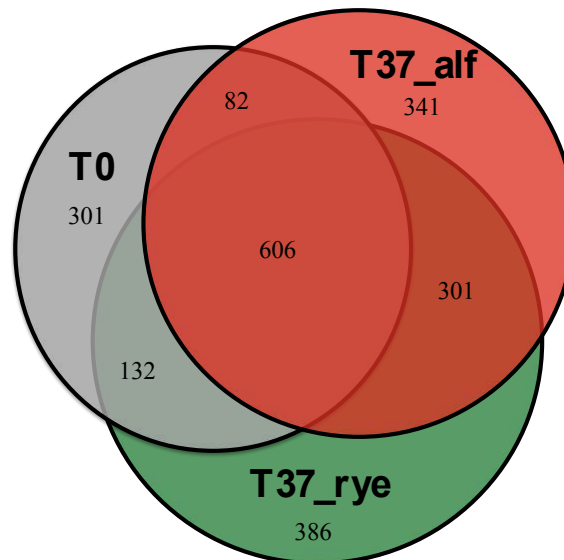


Figure 4.5. Venn diagrams comparing bacterial communities composition (OTU level) between T0 and T37 conditions for both plant species (T0 including T0_alf and T0_rye) and T37_alf and T37_rye. The shared OTUs between the three studied conditions were calculated after pooling replicate samples using the QIIME1.8.0 pipeline.

Non-metric multidimensional scaling (nMDS, **Figure 4.6**) based on relative abundances of OTUs revealed a clear distinction of bacterial community structure after 37 days depending on plant species, along the first axis (dim1) that also discriminated samples according to sampling depth for alfalfa. The second axis (dim2) discriminated samples according to sampling depth for ryegrass condition. Fitting of edaphic parameters to the ordination further showed that depth, bacterial abundance, root biomass, mass of rhizospheric soil, pH, dissolved organic carbon and carbohydrate contents (inositol, mannitol, xylose and fructose) were significantly correlated with bacterial community composition contrary to the total and bioavailable PAH concentrations. Among these correlated parameters, the four most impacting are the depth, the mass of rhizospheric soil, pH and bacterial abundance (Pearson correlation $R^2 = 0.78, 0.66, 0.59$ and 0.56 , respectively). DOC and bacterial abundance, significantly higher in alfalfa rhizotron, and carbohydrate quality (i.e. inositol concentration significantly higher in alfalfa contrary to mannitol, fructose and xylose concentrations that were higher in ryegrass) (Bourceret et al. in Press), were linked to differences in bacterial diversity between the two plant species. pH, that presented similar gradient in both rhizotrons (Bourceret et al. in Press), was linked to differences in bacterial diversity over the depth gradient induced by the root biomass

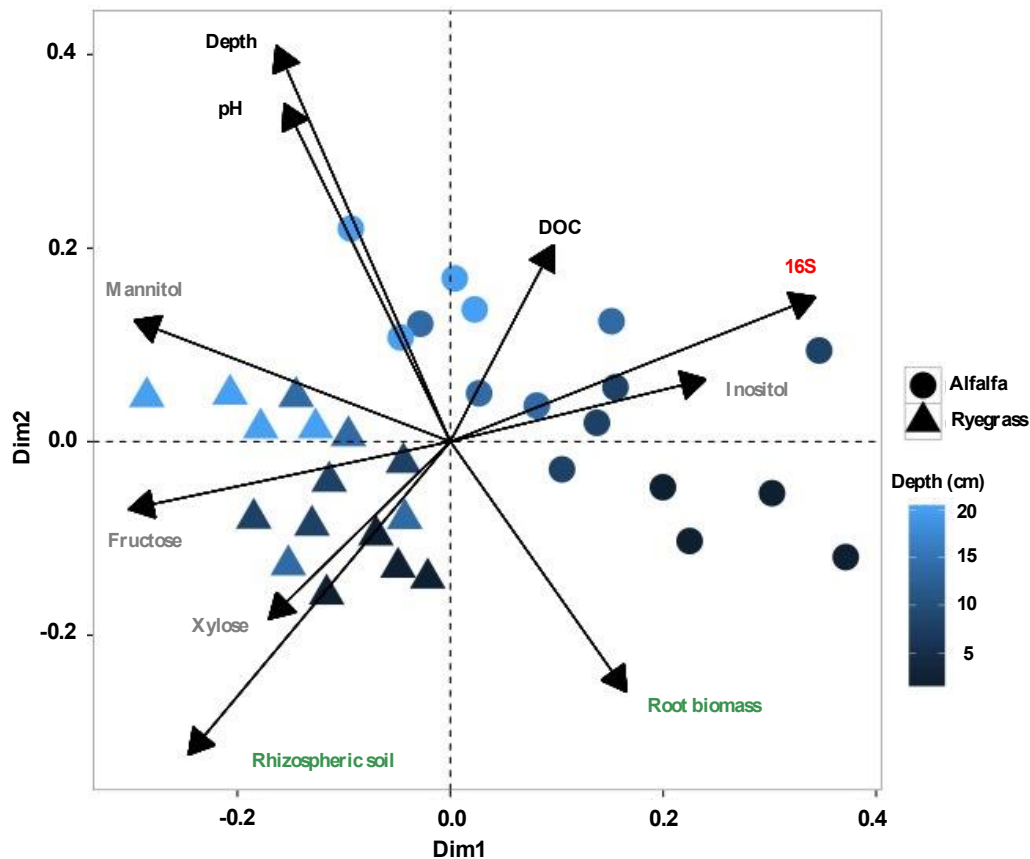


Figure 4.6. Non-metric multidimensional scaling ordination (nMDS) representing the impact of environmental factors (black arrow: edaphic parameters in black, sugar content in grey, rhizospheric parameters in green and bacterial abundance in red) on bacterial diversity in alfalfa (circle) and ryegrass (triangle) condition at 4 depths (blue gradients) after 37 days of plant growth. Each arrow represents one environmental parameter significantly correlated to the bacterial diversity ($p < 0.05$).

4.5 Discussion

4.5.1 Bacterial community modification during incubation period

The bacterial community was strongly modified during the 37 days of incubation in controlled growth chamber conditions (i.e. high temperature and 80% WRC). Half of the OTUs detected after 37 days with each plant species were not recovered at T0, and therefore probably belong to the rare biosphere of the NM soil. Temperature and humidity were previously shown to shape microbial diversity. For instance, Yergeau et al. (2012) observed increased microbial abundance and modification of soil microbial community in experimental field warming. On the other hand, Torres-Cortés et al. (2012) showed changes in rhizosphere bacterial community between dry and rainy season in the case of a specific semi-arid environment.

The bacterial community in the NM soil, well adapted to contamination due to its long-term PAH exposure (ca. 100 years), is dominated by *Proteobacteria* and *Actinobacteria* (Bourceret et al. 2015). Over time, due to both incubation conditions and plant development, the relative abundance of *Actinobacteria*, *Alpha-* and *Beta-Proteobacteria* increased. Development of *Actinobacteria* in the rhizosphere was previously described for several plant species (Li et al. 2014; Smalla et al. 2001; Kawasaki et al. 2012) including alfalfa (Cébron et al. 2009; Bourceret et al. 2015). We showed a rapid selection of these taxa in the present study, in agreement with Cébron et al. (2009) indicating that *Alpha-* and *Beta-Proteobacteria* classes were favored in presence of vegetation on the same aged PAH-contaminated soil (NM) after few years of culture *in situ*. Incubation conditions and plant development could result in increasing r-strategists that are able to respond rapidly to higher nutrient availability provided partially by root exudates (Fierer et al. 2007a).

The relative abundance of several OTUs affiliated to species known for organic pollutant biodegradation significantly increased during the 37 days of incubation. The use of PAHs as carbon source, revealed by the complete dissipation of the spiked fraction, would certainly fuel the growth of PAH-degrading bacteria. For instance, unclassified PYR.d3 species (OTU3) was previously isolated from a biostimulation trial using an oil-polluted soil (Milton et al. 2010). Moreover OTU1 was affiliated to the *Arthrobacter phenanthrenivorans* strain that was previously isolated from a creosote-polluted soil and described by Kallimanis et al. (2011) as able to use phenanthrene as a sole source of carbon and energy. Other authors developed a soil column system to study temporal modification of the indigenous phenanthrene-degrading community after a six-month exposure and identified *Thiobacillus* genus (OTU0 and OTU1632) as PAH degrader (Bodour et al. 2003). Besides PAHs, rhizotron soil also contained plant-derived carbon compounds that could activate PAH degraders. Indeed, many studies indicate a rhizosphere effect on pollutant-degrading bacterial community in contaminated soil. Amendment of polluted soil with purified root exudates or colonization by plants both resulted in bacterial community modifications and more precisely in the selection of specific PAH-degrading bacteria (Louvel et al. 2011; Storey et al. 2014). For instance Yergeau et al. (2014) showed in a greenhouse experiment on a soil contaminated with petrochemical residues that expression of hydrocarbon degradation genes increased in the willow rhizosphere and that rhizosphere effect was linked to PAH contamination rate. Furthermore, amendment of root deposits in a pyrene-spiked soil favored fungal and bacterial groups contributing to enhance biodegradation of pyrene (Wei et al. 2014).

In addition, the development of plants on the NM soil during the 37 days of incubation seemed to favor root-associated bacteria. Species such as *Pseudomonas brassicacearum* (OTU4) and *Herbaspirillum seropedicae* (OTU15) were described as beneficial bacteria associated to plant roots (Ortet et al. 2011; Pedrosa et al. 2011).

4.5.2 Plant species-specific effect on bacterial communities

The endogenous bacterial community of the NM soil was differently impacted by the two plant species. A quarter of the OTUs detected in each rhizotron were plant species-specific. Bacterial richness, diversity and evenness were significantly higher in ryegrass than in alfalfa rhizosphere. The relative abundance of some taxa increased specifically for each plant condition. The rhizosphere of alfalfa favored members of the *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Gammaproteobacteria*, whereas *Chloroflexi*, *Alpha-* and *Beta-Proteobacteria* were enriched in ryegrass rhizosphere. Several studies showed that plant species could impact bacterial community structure in the rhizosphere (Oliveira et al. 2014a; Kawasaki et al. 2012). For instance, plant species can select for specific bacteria in its rhizosphere, and this phenomenon is increased by repeated cultivation of the same plant species (Smalla et al. 2001). Moreover Siciliano et al. (2003) showed that catabolic genes involved in petroleum hydrocarbon degradation could be differentially selected by plant species (i.e. tall fescue and rose clover), influencing PAH degradation rates.

Differences in root structure, exudates concentration, composition and rate of production are the main factors driving bacterial colonization of the rhizosphere and bacterial community composition (Marschner et al. 2001; Berg and Smalla 2009). Indeed, the two studied plants possess a very contrasted root system. Alfalfa is characterized by a tap root system composed of a central root from which few lateral roots emerge (Aprill and Sims 1990). Meanwhile ryegrass features an extensively branched and fibrous root system with fine and profuse roots, that leads to high root length and higher total rhizoplane surface than alfalfa (Soleimani et al. 2010). Kirk et al. (2005) showed that alfalfa had a higher impact on bacterial community structure than ryegrass in hydrocarbon-contaminated soil by comparing DGGE profile similarity in DNA banding pattern obtained from alfalfa or mixed alfalfa/ryegrass conditions. Beside the bacterial community structure, the functional populations can also be affected. A lower denitrification activity was measured with leguminous than with graminaceous plant species, corroborating specific selection of some functional groups by root exudates and

residues in the rhizosphere (Chantigny et al. 1996).

Higher content of dissolved organic carbon in alfalfa rhizosphere could further explain the higher bacterial abundance compared to ryegrass. A positive correlation between microbial biomass and water-soluble organic carbon was previously described and variability between plant species was observed (Chantigny et al. 1996). While carbohydrates are not the main components of root exudates (ca. 5% of DOC), their analysis provides information about differences in the nature of compounds released by the two plant species. The higher inositol content in alfalfa rhizosphere (Bourceret et al. in Press) might select specific bacteria compared to ryegrass rhizosphere, which was richer in mannitol, xylose and fructose. Previously Baudoin et al. (2001) showed using metabolic fingerprint (Biolog[®]) that difference in rhizodeposits between different parts of maize roots could induce specific shifts in functional potential of microbial population.

Although we previously showed greater PAH dissipation and lower bioavailable PAH content in alfalfa than ryegrass rhizotron after 37 days (Bourceret et al. in Press), the present study did not evidence any significant correlation between PAH concentration and bacterial community structure. This suggests that rhizosphere effect was stronger than PAH concentration effect on shaping soil bacterial assemblages.

4.5.3 Depth gradient of bacterial communities

Some studies have shown that bacterial community structure is modified with stage of plant development (Baudoin et al. 2002; Chiarini et al. 1998) and root location (Baudoin et al. 2001; Cavaglieri et al. 2009), both linked to the root exudates quality. So far, these studies focused mainly on the maize rhizosphere effect and on non-contaminated soil. In Bourceret et al. (in Press) we previously indicated that depth was positively correlated with pH and negatively correlated with root biomass in the NM soil, in turn structuring spatially the bacterial community for alfalfa and ryegrass systems. The slight acidification linked to the higher root biomass at shallow depth (Hinsinger et al. 2003) could select some taxa, as the pH was previously described as a main driver of bacterial community (Rousk et al. 2010). Few authors suggested that spatial variability across the rhizosphere, due to heterogeneity of nutrient release, induces spatial gradient of bacteria. For instance Corgié et al. (2006) observed in a compartmented device that bacterial community composition was different depending on distance from roots, inducing a spatial dissipation gradient of PAHs in the rhizosphere, as it was also indicated by Ma et al. (2012a). Moreover, PAH degraders were

previously described in a rhizospheric gradient, namely with higher abundance nearest to the roots (Corgié et al. 2003).

Concerning alfalfa, bacterial diversity, richness and evenness were negatively correlated with the root biomass. The relative abundance of *Actinobacteria* increased near the surface where root biomass and inositol content were higher and pH more acidic, while *Gemmatimonadetes* and *Proteobacteria* were favored at greater depth. Exudation is known to be greater at the root apex, and hence expected to be higher at greater depth in alfalfa rhizotron due to its root structure. The quality of exudate compounds is known to vary depending on the age of plant roots (Walker et al. 2003; Yang and Crowley 2000), thus creating depth gradient due to the presence of older roots at shallow depths. Although no spatial gradient in DOC content was observed, we found the highest bacterial diversity at greater depth potentially due to differences in exudate quality. These results contrast with previous studies in non-contaminated soil, where root exudation leads to nutrient selection for fast-growing species and to a lower diversity (Marilley and Aragno 1999; Kowalchuk et al. 2002).

In contrast with alfalfa, the ryegrass root biomass was more homogeneous along the depth profile. Accordingly, we did not evidence spatial gradient of bacterial diversity nor identify OTUs impacted significantly with depth in ryegrass rhizosphere despite the root sugar gradient. Nevertheless, multivariate analysis showed a small trend of depth structuration of the bacterial community composition.

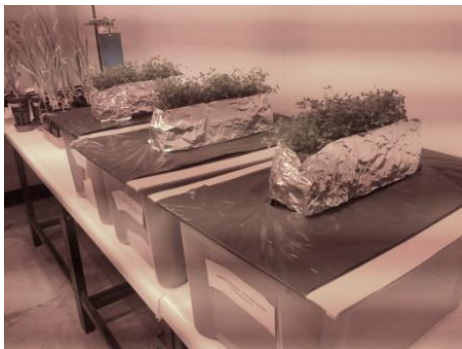
4.6 Conclusion

Incubation of aged PAH-contaminated soil with plants increased at phylum level the relative abundance of *Actinobacteria*, *Alpha-* and *Beta-Proteobacteria* and at OTU level organic pollutant degraders and root-associated bacteria. Plant species impacted bacterial diversity by favoring *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Gammaproteobacteria* in alfalfa and *Chloroflexi*, *Alpha-* and *Beta-Proteobacteria* in ryegrass rhizosphere. In spite of contrasted bacterial diversity between the two plant rhizosphere, we could not evidence correlation with the differences in PAH dissipation, suggesting that fate of PAH probably depends mainly on bacterial activity level. Despite physical and chemical gradients shown in both rhizotrons, only alfalfa root development led to a spatial variability with depth of the bacterial diversity, showing increase of *Actinobacteria* near the surface, and increase of *Gemmatimonadetes* and *Proteobacteria* at greater depth.

4.7 Acknowledgments

The authors have no conflict of interest to declare. This study was part of the RhizOrg project funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-JSV7-0007_01).

Chapitre 5 :
Etude de la cinétique de dégradation des HAP et de l'activité microbienne dans la rhizosphère d'un sol contaminé



Au cours des deux chapitres précédents, présentant les résultats obtenus lors d'une première étude en rhizotron, nous avons montré qu'après 37 jours de croissance racinaire la totalité de la fraction disponible en HAP avait été dégradée et que cette dégradation s'accompagnait d'une augmentation des populations bactériennes dégradantes et d'une modification de la diversité, chez les deux espèces végétales étudiées. Une dégradation plus efficace de HAP et une structuration spatiale plus importante ont été observées dans la rhizosphère de la luzerne par rapport au ray-grass. Toutefois, cette étude avait été menée sur deux temps (T0 et T37) et l'absence de dispositif non planté à 37 jours ne permettait pas de conclure sur l'effet plante. Nous avons donc souhaité préciser la cinétique des processus sur un temps plus court, en analysant la biodégradation des HAP et l'activité microbienne au cours de la croissance de la luzerne sur une durée d'un mois, avec un prélèvement par semaine et en comparaison avec un témoin non planté.

Afin de préciser la cinétique de dégradation des HAP et l'activité des bactéries capables de dégrader les HAP dans la rhizosphère, nous avons mis en place une expérimentation dans un deuxième type de rhizotron présenté au cours de ce chapitre, avec le même sol NM historiquement contaminé. Huit dispositifs (4 plantés avec de la luzerne et 4 non plantés), composés de deux compartiments assemblés (T0) (un mini-rhizotron, rempli de terre de NM et un rhizotron similaire à celui de la première étude rempli de terre de NM recontaminée), ont été préparés. Puis 18 échantillons (6 réplicats à 3 profondeurs) par dispositif planté et non-planté ont été prélevés à 4 temps différents (6 (T1), 12 (T2), 16 (T3) et 22 (T4) jours) afin de suivre l'évolution au cours du temps de la biomasse et la longueur racinaire, de la teneur en carbone organique dissous (COD) et du pH, des concentrations en HAP totaux et biodisponibles et de l'abondance (ADNg) et de l'activité (ARN) des populations microbiennes. L'ensemble des échantillons a été analysé, en revanche pour simplifier et faire ressortir les résultats majeurs, ce chapitre ne présente que les données acquises sur la première profondeur (3 cm), où les racines de luzerne étaient présentes à tous les temps, et aux différents temps. Les résultats obtenus en fonction de la profondeur de prélèvement sont présentés en annexes.

Au cours de cette étude, nous avons montré que la totalité des HAP disponibles apportés par la recontamination a été dégradée au bout de 6 jours, et que certains composés polaires oxygénés ont été produits durant cette période. Une dégradation plus importante a été observée en présence de luzerne que dans le témoin sans plante. La présence de plante, à travers la libération de sources de carbone facilement dégradable, semble favoriser à court-

terme la dégradation des HAP par co-métabolisme. De même, l'abondance et l'activité des deux populations bactériennes capables de dégrader les HAP suivaient une dynamique différente avec ou sans plante. En effet, le taux de transcription des gènes de HAP-dioxygénases appartenant aux bactéries dégradantes à Gram-négatif était plus élevé transitoirement à 12 jours (T2) puis diminuait contrairement à celui des bactéries dégradantes à Gram-positif qui restait constant jusqu'à 22 jours (T4). La diminution de la concentration en HAP biodisponibles au cours du temps semble réprimer l'activité dioxygénase. Ces travaux font l'objet d'une publication à soumettre.

5. Rapid PAH degradation in alfalfa rhizosphere soil is linked to the dynamic of the PAH-degrading microbial community activity

Amélia Bourceret^{1,2}, Corinne Leyval^{1,2}, Pierre Faure^{1,2}, Catherine Lorgeoux^{3,4}, Aurélie Cébron^{1,2}†

¹Université de Lorraine, LIEC UMR7360, Faculté des Sciences et Technologies, Bd des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

²CNRS, LIEC UMR7360, Faculté des Sciences et Technologies, Bd des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

³Université de Lorraine, GéoRessources UMR 7359, Faculté des Sciences et Technologies, Bd des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

⁴CNRS, GéoRessources UMR 7359, Faculté des Sciences et Technologies, Bd des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

† Corresponding author: aurelie.cebron@univ-lorraine.fr; phone: (+33) 383684296

Key words: contaminated soil, alfalfa, rhizosphere, rhizodegradation, bacterial diversity, PAH-degraders, functional community

5.1 Abstract

Rhizodegradation is considered for PAH remediation of contaminated industrial soil but contrasted results were reported. We hypothesized that the temporal variability of PAH bioavailability and rhizosphere processes could impact microbial density and degradation activity in the soil, and result in different dissipation rates. We studied PAH dissipation in a PAH-spiked contaminated soil over 22 days of alfalfa development in comparison with unplanted soil using rhizotrons and sampling once a week. In both conditions, most of the spiked PAHs were dissipated within the first weeks, conducting to polar compound production. After 12 days PAH dissipation was significantly higher in the planted rhizotron, which was related to the increased bacterial abundance and PAH-dioxygenase gene transcription compared to unplanted soil. Early during the time course, the root exudates, that are more easily degradable carbon source than PAHs, acted positively on pollutant degradation, probably through co-metabolism. However with time the PAH-dioxygenase gene transcription was repressed when bioavailable PAH concentration was very low. Among the two studied PAH-degrading population, Gram-negative bacteria (*Proteobacteria*) seemed to be involved in the rapid degradation of bioavailable PAHs since their activity increased

specifically after 12 days, contrary to Gram-positive bacteria (*Actinobacteria*) that presented a constant activity over time.

5.2 Introduction

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are organic pollutants resulting from coal derived industrial activities, such as coking, iron and steel production plants. These toxic compounds are persistent in the environment. Their high hydrophobicity, leading to adsorption to soil matrix, reduces their bioavailability to microbial biodegradation (Bogan and Sullivan 2003). This decrease in historical pollution bioavailability in soil over time, named aging process, slows down the rate of PAH degradation in the environment (Allard et al. 2000; Ma et al. 2012b). Furthermore PAH contamination is heterogeneously distributed in the environment at large (km) as well as smaller scales (cm-mm) (Villanneau et al. 2013; Hybholt et al. 2011) due to soil properties (Choudhary and Mantri 2000; Amellal et al. 2001a). Indeed, soil organic matter content and heterogeneity (Cornelissen et al. 2005; Bogan and Sullivan 2003) and intrinsic physico-chemical characteristics (Styrishave et al. 2012; Tunega et al. 2009) govern PAH accessibility and reactivity in soil. PAH heterogeneity leads to a spatial variability of microbial community abundance (Törneman et al. 2008; Bengtsson et al. 2010), diversity (Törneman et al. 2008; Mukherjee et al. 2014; Bengtsson et al. 2013) and respiration or carbon mineralisation activity (Bengtsson et al. 2010; Hybholt et al. 2011; Mukherjee et al. 2014). Moreover, an increase in PAH degrading bacterial abundance was observed in soil and was linked to hotspots of pollution (Bengtsson et al. 2013). In this kind of historically polluted soil, microbial diversity evolves over time, suggesting adaptation to contamination level (Bourceret et al. 2015).

Rhizodegradation is a cost effective and environmental-friendly process, using microorganisms associated to roots, to dissipate organic pollutant in soil. Several studies proposed to use rhizodegradation to remediate PAH contamination (Haritash and Kaushik 2009; Bisht et al. 2015; Alagić et al. 2015). Plants release root exudates composed among others compounds of sugars, amino and organic acids (Walker et al. 2003), providing carbon sources for microorganisms and favouring their growth. In PAH contaminated soils, exudate release has been shown to increase microbial abundance (Kirk et al. 2005) and activity (Cébron et al. 2011a). Several studies showed that plant enhances PAH dissipation by modifying microbial diversity (Kawasaki et al. 2012; Cébron et al. 2009), and selecting PAH-degraders (Oliveira et al. 2014b; Storey et al. 2014; Siciliano et al. 2003; Bell et al. 2014) in

the rhizosphere. Other experiments indicated that plant rhizodeposits modify the active microbial community diversity in polluted soil (Yergeau et al. 2014; Pagé et al. 2015; Peng et al. 2015). Secondary plant metabolism produces also some organic acids (Gao et al. 2015) or biosurfactant compounds that increase PAH bioavailability (Joner et al. 2002; Sun et al. 2013; Blyth et al. 2015; Zhou et al. 2011) and PAH dissipation. Consequently, most studies indicated that the combination of all these processes leads to an increase in PAH degradation with plant (Liste and Alexander 2000; Binet et al. 2001; Chiapusio et al. 2007; Tejeda-Agredano et al. 2013) and more precisely in the rhizosphere. However other experiments described also no effect (Cébron et al. 2009; Cébron et al. 2011b; Gartler et al. 2014), a slow down (Bourceret et al. 2015), or reduction (Louvel et al. 2011) of PAH degradation in planted compared to bare soil.

The spatio-temporal dynamic of rhizospheric processes could explain the variability concerning PAH degradation efficiency with plant. Indeed, depending on stage of plant development and root location, the composition and quantity of root exudates can evolve (Hinsinger et al. 2005; Walker et al. 2003) and can thus modify microbial community (Yang and Crowley 2000; Hannula et al. 2010; Baudoin et al. 2002; Broeckling et al. 2008), functional diversity (Haichar et al. 2008) and microbial activity (Baudoin et al. 2001) (Baudoin et al. 2002). Spatial variability of the fate of PAHs, according to root distance, was previously shown (Corgié et al. 2003; Ma et al. 2012a; Ling et al. 2013) leading to spatial gradient of the global (Corgié et al. 2004) and functional (Ma et al. 2015) bacterial community in the rhizosphere. Among different plant species tested for PAH rhizodegradation, the efficiency of legumes such as alfalfa was indicated, thanks to their extensive root systems that allow soil colonization and nutrient uptake (Muratova et al. 2003; D’Orazio et al. 2013). In a previous study using rhizotron devices, we showed the total degradation of spiked PAHs and an increase in the microbial and PAH-degrading population after 37 days of alfalfa development (Bourceret et al. in Press). Besides, we studied the spatial variability in the alfalfa rhizosphere at the centimeter scale after 37 days and showed a depth gradient for root biomass, exudate concentration and pH, established, and also a bacterial diversity gradient (Bourceret et al. Submitted). However the timescale of these processes within the 37 days were not defined and no unplanted controls were included.

We hypothesized that PAH dissipation in the rhizosphere in 37 days was linked to root development, inducing a temporal variability of microbial community and PAH degrading

bacterial abundance, and probably of the active part of the microbial community during plant growth. We developed a specific rhizotron device to study the PAH dissipation over time, and compare it with unplanted condition. Rhizotrons were filled with a historically aged PAH contaminated soil, initially spiked with a complex soil organic extract to increase PAH bioavailability (Bourceret et al. 2015). Rhizotrons were planted with alfalfa or unplanted and sampled once a week for one month to study the PAH degradation and potential metabolite (polar polycyclic aromatic compounds, pPAC) formation kinetic. Dissolved organic carbon (DOC), pH and humidity were measured to characterize the rhizosphere and soil conditions. Total bacterial and fungal community and PAH-degrading bacterial population abundances and transcriptional activities were assessed from extracted DNA and RNA fractions, respectively.

5.3 Materials and Methods

5.3.1 Experimental device

We used an aged PAH contaminated soil, from a former coking plant (Neuves-Maisons (NM), Lorraine, France) to perform rhizotron experiments. Soil characteristics and spiking procedure were described previously in Bourceret et al. (in Press). Briefly, the NM soil was air-dried, sieved at 2 mm and spiked with a complex organic pollutant extract obtained from the same soil using chloroform (Cébron et al. 2013). After solvent evaporation, the spiked soil was mixed with NM soil not exposed to chloroform, in a one-tenth ratio.

Experimental device was divided in two parts (**Figure 5.1**): the top part (mini-rhizotron) was a poly-methyl methacrylate box (7 cm high x 29.8 cm long x 2.3 cm wide) without bottom that fits into the second part: a rhizotron (30 cm high x 30 cm long x 2.5 cm wide) with a removable front face allowing sampling as described in Bourceret et al. (in Press). First, 8 mini-rhizotrons were filled with NM soil, closed at the bottom by bolting cloth (5 μm mesh), and adjusted to 80% of the soil water holding capacity (WHC) (corresponding to 203 ml per kg of dw soil). Alfalfa (*Medicago sativa* var. Europe) was planted on 4 of these devices by seeding 2.4 g of seeds (*c.a.* 26 seeds per cm^2) and the other 4 devices were left unplanted. After germination, the 8 devices were placed in a plant growth chamber with controlled conditions (22°C /18°C day/night, 80% relative humidity, *c.a.* 250 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 hours photoperiod) and were maintained at 80% of the WHC by weighting the devices. After 15 days, when roots reached the bottom of the mini-rhizotron devices, eight rhizotrons were filled with spiked soil (1418 \pm 193 mg of $\Sigma 13$ PAHs per kg of dw soil), bolting cloths of the

mini-rhizotrons were removed and devices were fitted in their corresponding rhizotron to allow root penetration and growth in spiked soil. This time corresponded to T0. Six aliquots from each of the eight batches of spiked NM soil (corresponding to 48 samples) were stored at -80°C for analyses of the T0. Then the 4 planted and 4 unplanted devices were incubated in plant growth chamber in conditions described above. After 6 (T1), 12 (T2), 16 (T3) and 22 (T4) days of plant growth, two rhizotrons (one planted and one bare) were opened to allow core sampling using a stainless steel cylinder equipped with a PTFE piston (1.6 cm diameter, 2.5 cm long). At 3 cm from the interface of the two compartments, 6 samples with 3 cm between the core centers were collected per device (**Figure 5.1**).

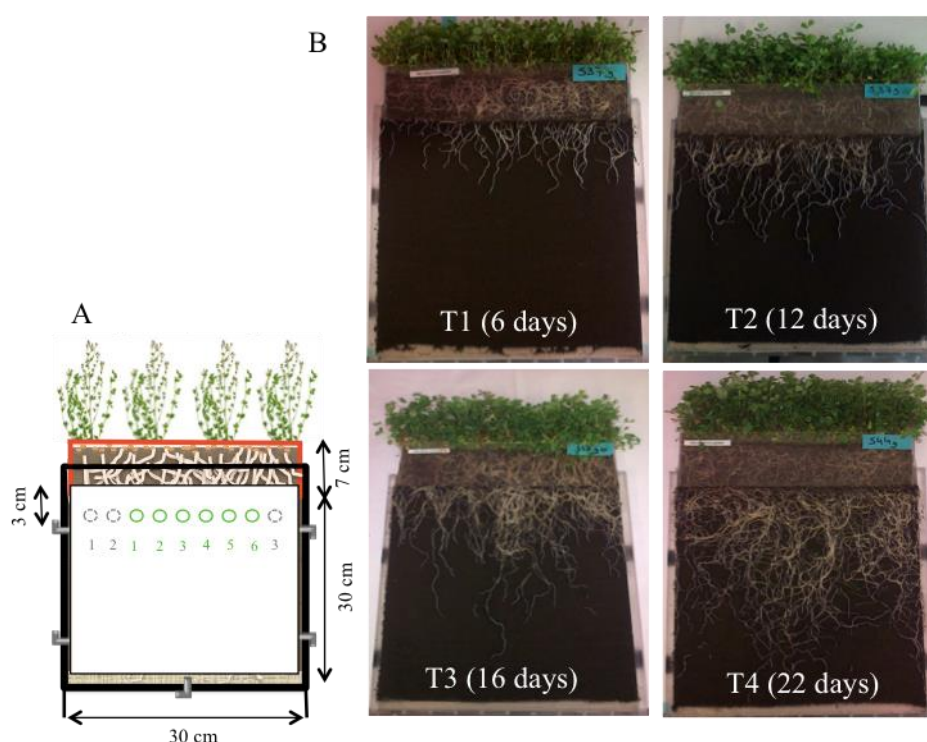


Figure 5.1. Illustration of the experimental device over time. (A) The device was composed of a mini-rhizotron (in orange) fitting in a corresponding rhizotron (in black). At the depth 3 cm, six samples (in green) were collected, 3 samples (in gray) were used for soil humidity measurements, and 4 supplemental samples collected between green locations allowed quantification of dissolved organic carbon (DOC). (B) Pictures of alfalfa rhizotron devices (B) after 6 (T1), 12 (T2), 16 (T3) and 22 (T4) days of plant growth.

Soil samples were prepared as previously described in Bourceret et al. (in Press). Briefly, after 3 rinsing by sterile water, roots were spread on a black paper and photographed to estimate the size of each root fragment using ImageJ software. Roots were then air-dried at 60°C and weighed to quantify dry root biomass. Rhizosphere soil, collected from root rinsing water, and bulk soil were weighed to calculate the ratio between the two fractions and were mixed together to obtain a unique soil sample stored at -80°C before pH, COD, PAH and

pPAC analyses, and DNA extractions. Soil humidity was measured by collecting 3 other samples on the side of the rhizotrons and by weighing the soil before and after drying at 60°C for 48 hours.

5.3.2 pH and COD analyses

Soil solutions were prepared with 1 g of soil in distilled water (1:5 w/v ratio), and pH was measured using a pH-meter electrode (BioBlock scientific, pHM210 Radiometer analytical). After centrifugation (10 min, 4000 rpm, 20°C) supernatant was filtered (0.45 µm) and diluted 20 times to quantify dissolved organic carbon (DOC) with a total organic carbon analyzer (TOC-V CSH, Shimadzu).

5.3.3 Quantification of total PAHs and pPAC and bioavailable PAHs

An aqueous solution of hydroxypropyl-β-cyclodextrin (20 ml, 50 mM) (Acros organics, New Jersey, USA) was used to extract available PAH fraction from 1 g of fresh soil from 5 NM soil samples before spiking, 6 T0 samples, and 48 rhizotron samples (6 samples at each sampling time) in Oak Ridge Centrifuge tubes (FEP, Nalgene, USA) (Reid et al. 2000). After stirring (100 rpm) for 16 hours at 24 °C and 2 centrifugation steps (10000 rpm, 20 min), dichloromethane was added (24 ml) to the aqueous supernatant (*c.a.* 30 ml) to extract PAHs. An Accelerated Solvent Extractor (ASE350 Dionex ®) was used to extract with dichloromethane (130°C, 100 bars) total PAHs from 0.250 g of soil (stored at -80°C) from 12 NM soil samples before spiking, 48 T0 samples, and 48 rhizotron samples previously lyophilized and finely ground.

Dichloromethane extracts were splitted in two fractions to quantify PAHs by HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) and pPAC (polar Polycyclic Aromatic Compounds) by GC-MS (gas chromatography coupled to mass spectrometry). Firstly, dichloromethane extracts were evaporated under nitrogen flow and diluted in 5 ml and 20 ml of acetonitrile, for available and total fraction, respectively. HPLC (Dionex Ultimate 3000) system, with a 100-mm long and 4.6-mm internal diameter separation column (SupelcoAscendis Express C10), 2.6-mm granulometry allowed quantifying PAHs from 10 µl of extract. From total and bioavailable extracts, 13 PAHs (16 US-EPA PAHs excluding the three more volatile molecules: naphthalene, acenaphthylene and acenaphthene) were quantified by using a UV (254 nm) and a fluorescence detector, respectively. Secondly, from dichloromethane extracts pPAC were quantified on a GC-6890 (Agilent) equipped with a DB5- MS column (60 × 0.25

mm id \times 0.1 μm film thickness), coupled to a MS-5973 Inert (Agilent), in the SIM mode (Single Ion Monitoring). The oven temperature program was as follow: 2 minutes at 70 $^{\circ}\text{C}$, then from 70 $^{\circ}\text{C}$ to 130 $^{\circ}\text{C}$ at 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, then from 130 $^{\circ}\text{C}$ to 315 $^{\circ}\text{C}$ at 4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ and then a 25 min hold at 315 $^{\circ}\text{C}$. The carrier gas was helium at 1.4 mL min^{-1} constant flow. Fifteen pPACs including 11 oxygenated pPACs (O-PACs) and 4 nitrogenated pPACs (heterocyclic PACs containing nitrogen N-PACs) were quantified by an internal calibration using a deuterated internal standard (the list of the 15 quantified polar PAC is given in Hanser et al. (2015)). Each compound was corrected according to the recovery of the internal standards, and the overall calibration was verified with 2 analyses of control standard before and after the injections of the samples.

5.3.4 DNA/RNA extraction

Nucleic acids were extracted from 0.5 g of soil using a FastDNA SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, France). Firstly, DNA was extracted on 12 planted T1 lyophilized soil subsamples also used for PAH extraction, to study correlation between PAH content and abundance of PAH dioxygenase gene. Secondly, DNA and RNA were co-extracted from an aliquot of all samples stored at -80°C . DNA was resuspended in 100 μl of DES (Dnase-free water) and quantified at 480 nm (Xenius, SAFAS) by using Quant-iT PicoGreen asDNA Assay kit (Invitrogen), and then extracts were diluted to 2 $\text{ng}/\mu\text{l}$ before amplification.

RNA was collected from the filtrates at the DNA binding to the column step. After sodium acetate (0.1Vol, 3M, pH 5.2) and isopropanol precipitation one night at 4°C and centrifugation, RNA was resuspended in 45 μl of Rnase-free water. Two steps of DNase (Thermo scientific) treatment and purification using RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen) allowed obtaining 30 μl of pure extract (presence of DNA contamination was PCR checked). Briefly, 10 μl of DNase buffer (10x) and 1 μl of DNase (1u/ μl) were incubated 1 hour at 37°C with extracts and purified in column. After quantification at 480 nm (Xenius, SAFAS) by Quant-iT RiboGreen RNA Assay kit (Invitrogen), extracts were converted in cDNA using SuperScript III First-Strand kit (Invitrogen). Reverse transcription reaction (20 μl) was performed using 1 μl of random hexamer (50 $\text{ng}/\mu\text{l}$), 1 μl of hybridation buffer and 22.27 ng of RNA (5 min at 65°C and 1 min on ice), then 10 μl of reaction buffer (2x) and 2 μl of enzyme mix were added and incubated 10 min at 25°C , 50 min at 50°C and 5 min at 85°C .

5.3.5 Real-time PCR quantification

The primer sets Fung5F /FF390R (Lueders et al. 2004; Thion et al. 2013), 968F /1401R (Felske et al. 1998; Cébron et al. 2008) and PAH-RHD_α GN F/R, PAH-RHD_α GP F/R (Cébron et al. 2008), targeting the fungal 18S and the bacterial 16S rRNA genes, and the PAH-ring hydroxylating dioxygenase genes from Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively, were used to quantify by real-time PCR the abundance of active and total fungal, bacterial and PAH-degrading bacterial populations. Amplification reactions were performed on 20 µl of reaction mix containing 10 µl of iQ SYBR green SuperMix (Bio-Rad), 0.8 µl of each primer (10 µM), 0.4 µl of 3% BSA (bovine serum albumin) solution, 0.2 µl of DMSO (dimethyl sulfoxide), 0.08 µl of T4 bacteriophage gene 32 product (MP Biomedicals, France) and 1 µl of diluted gDNA or pure cDNA. Amplification and quantification were achieved using a CFX96 Real-Time PCR detection system (Bio-Rad) according to standard plasmid dilution series and program described in Cébron et al. (2008) and Thion et al. (2012). After soil humidity correction, data were expressed in number of gene copies per gram of dry weight soil, in percentage of transcripts relative to gene copies, and in percentages of 18S rRNA or PAH-dioxygenase relative to 16S rRNA gene or transcript copies.

5.3.6 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using XLStat 2013 software (Addinsoft). One-way analysis of variance (ANOVA, with $p < 0.05$) followed by a Newman-Keuls multiple comparison test was performed to measure the time effect in each condition (planted and unplanted) between T0 and T4. Two-way analysis of variance (ANOVA, with $p < 0.05$), followed by a Newman-Keuls multiple comparison tests, was performed to measure the time and plant effect between T1 and T4. Box plots were drawn using PAH data to compare their distribution and variability. Principal component analysis (PCA) was carried out. Correlations between soil properties were studied by drawing correlation circles and by calculating Pearson's correlation matrix (**Annexe 5.1 Table S1**).

5.4 Results

5.4.1 Root biomass and length, humidity, pH and DOC

Humidity stayed constant (around 80% of the WRC) over time in both planted and bare soil rhizotrons but was globally significantly higher in bare soil (data not shown). In alfalfa rhizotron, root biomass was significantly ($p < 0.05$) higher after 22 days of plant development than after 6 days, whereas root length significantly increased over time and was significantly

different between T1 and T2 and then between T3 and T4 (**Figure 5.2**). Soil pH increased significantly over time in both conditions and was stable after 12 days. It increased more rapidly in the planted than in the bare soil rhizotron with a significant difference at T1. DOC stayed constant over time in both rhizotrons until 16 days, but increased significantly in alfalfa planted rhizotron after 22 days (**Figure 5.2**).

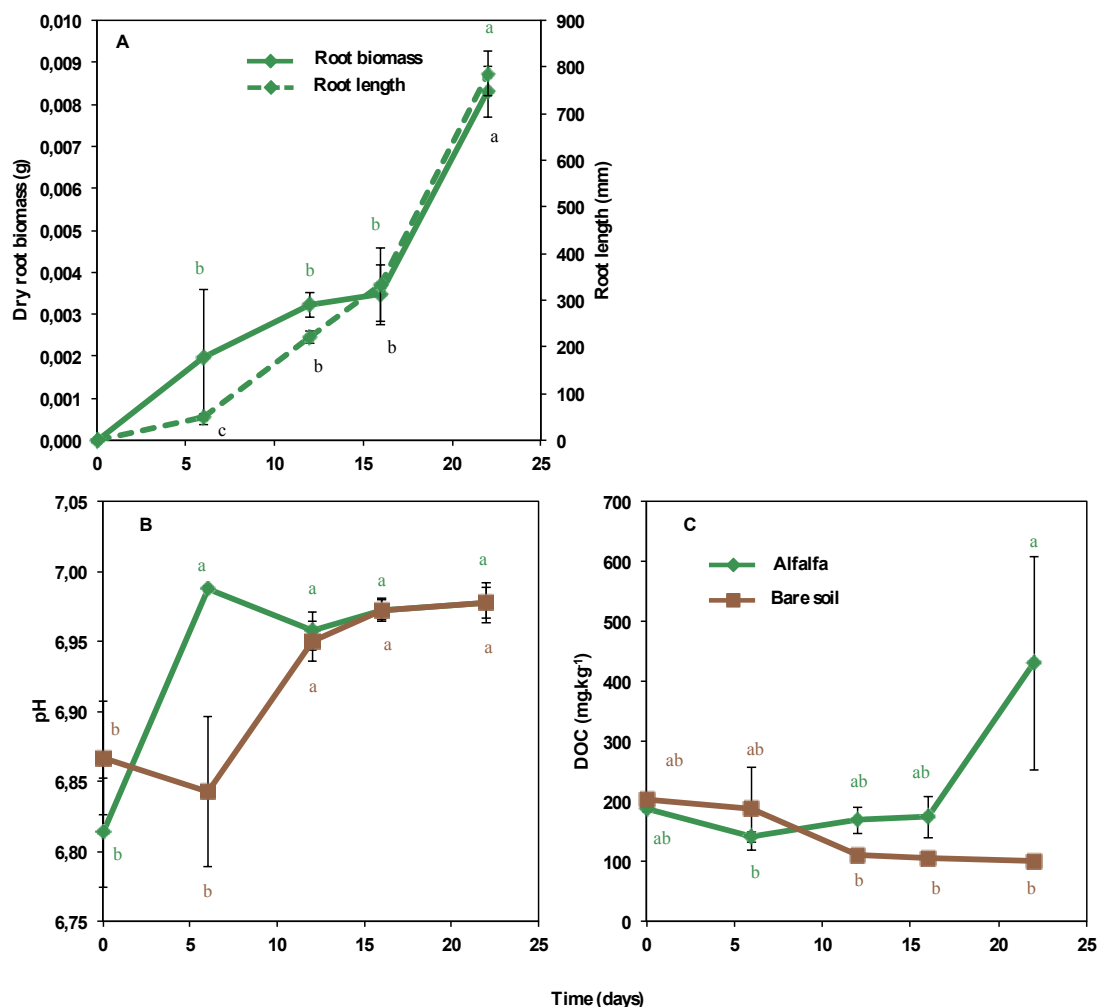


Figure 5.2. Soil and root characteristics over time. Dry root biomass and length (A), pH (B) and dissolved organic carbon (DOC) (C) after 6 (T1), 12 (T2), 16 (T3) and 22 days (T4) in planted (orange) and unplanted (brown) soils. Means (n=6 for root biomass and length, and n=4 for pH and DOC) and standard errors. Letters indicate significant ($p < 0.05$) effects of time and presence of plant evaluated by using two-way ANOVA and Neuman Keuls *post Hoc* test.

5.4.2 PAH and pPAC content

The total PAH concentration of the NM soil ($1033 \pm 148 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ dw soil}$) was significantly increased ($p < 0.05$), i.e 27 %, after soil spiking with the organic pollutant extract and reached $1418 \pm 193 \text{ mg.kg dw soil}^{-1}$ at the beginning (T0) of the experiment. The bioavailable PAH fraction was also increased by 41 % and reached $64 \text{ mg.kg dw soil}^{-1}$. The total PAH

concentration decreased significantly between T0 and T1 and stayed constant until T4 in both planted and unplanted rhizotrons (**Figure 5.3**). After 6 days, the total PAH concentration dropped down to 1200 ± 210 and 1024 ± 190 mg.kg dw soil⁻¹ in unplanted and planted soil, respectively, corresponding to a decrease in 19 and 24 % relative to the initial concentration, and to 70 and 100% of biodegradation of the spiked PAH fraction, respectively. Concentration of several compounds decreased after 6 days (fluorene, phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)pyrene and indeno(1,2,3-c,d)pyrene, whereas concentration of other PAHs remained constant (anthracene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene) or increased (benzo(k)fluoranthene and benzo(g,h,i)perylene) after 22 days (data not shown). Bioavailable PAH fraction decreased also significantly between T0 and 6 days in both conditions, reaching 0.05 ± 0.01 and 0.08 ± 0.03 mg.kg⁻¹ dw soil, corresponding to ca. 100 % decreases, for planted and unplanted soil rhizotron, respectively. From one week, the bioavailable PAH fraction reached significant lower values than in the soil before spiking in unplanted and planted conditions (0.038 ± 0.021 and 37.3 ± 15.6 mg.kg⁻¹ dw soil, in rhizotrons and NM soil, respectively). The concentration in total PAHs was lower in alfalfa than in bare soil, and the difference between both conditions was significant after 12 days (996 ± 203 and 1260 ± 188 mg.kg⁻¹ dw soil in planted and unplanted soil, respectively) (**Figure 5.3**).

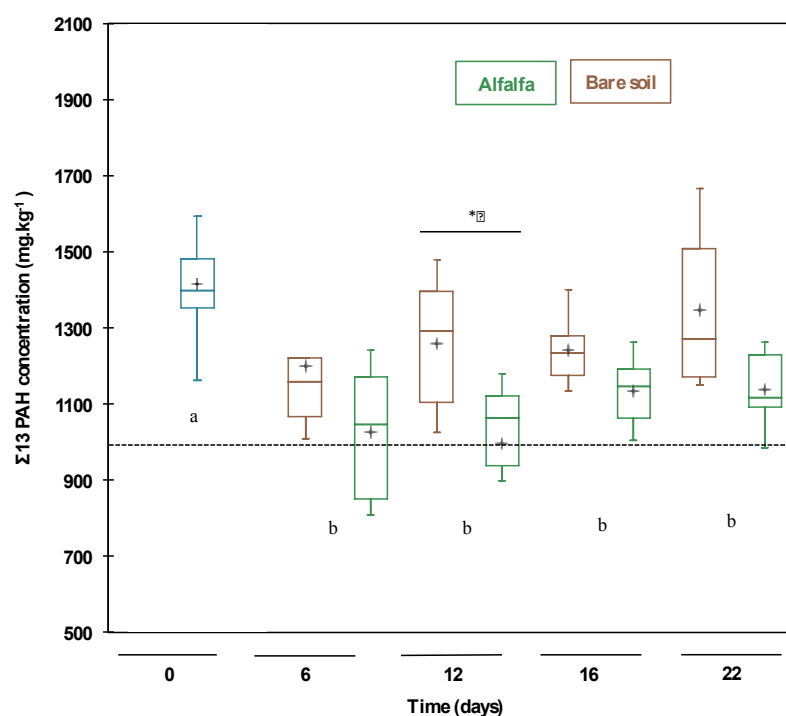


Figure 5.3. PAH concentration (sum of 13 US-EPA PAHs) after 6, 12, 16 and 22 days in planted (green) and unplanted (brown) soils. Box plots show value variability and means (black cross), n=24 (for T0 samples) and n=6 (T1 to T4 samples). Dashed line indicate mean of PAH concentration in the NM soil

before spiking. Black asterisks indicate significant differences between planted and unplanted soil (Student t test, $p < 0.05$) and letters indicate significant differences depending on time (ANOVA).

Ten oxygenated and one nitrogenous pPAC compounds were detected in initial soil (T0) and in alfalfa planted and unplanted soil samples after 6 days. After 6 days (T1) the concentration of 4 oxygenated pPAC (methylantracene-9,10-dione, benzoanthracenedione, naphthacene-5,12-dione) was significantly higher than at T0, without significant differences between planted and unplanted soils. For benzo(cd)pyrene, the difference between T0 and 6 days (T1) was only significant in the planted rhizotron. The concentration of the other pPAC stayed constant over the first week for both planted and unplanted soils (**Figure 5.4**).

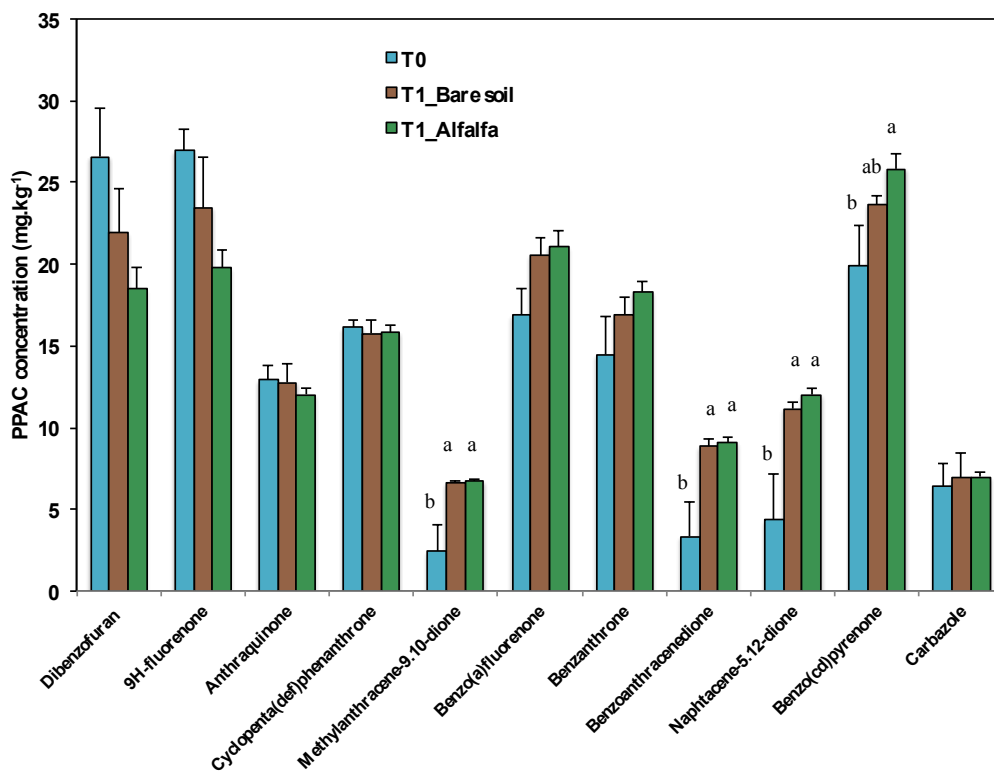


Figure 5.4. Nitrogenous and oxygenated pPAC concentration over time (at T0 and T1) in planted (green) and unplanted (brown) soils. Values are means ($n=6$) and standard errors. Letters indicate significant differences in pPAC concentrations between T0 and T1, and depending on presence of plant (one-way ANOVA).

5.4.3 Active and total microbial communities

Total community was dominated by bacteria that were also more active over time in both planted and bare soil (mean value of $7.84 \times 10^8 \pm 6.64 \times 10^8$ 16S rRNA gene copies and $1.12 \times 10^{10} \pm 1.25 \times 10^{10}$ transcript copies g dw soil⁻¹) while fungi were 100 times less represented (mean value of $9.94 \times 10^6 \pm 7.04 \times 10^6$ 18S rRNA gene copies and $2.05 \times 10^8 \pm 1.48 \times 10^8$ transcript copies g dw soil⁻¹) (**Figure 5.5 A, B**). Abundance of 16S rRNA genes tended to

increase over time in alfalfa and stayed constant in unplanted rhizotron whereas number of 16S rRNA transcripts increased significantly between T0 and 6 days (T1) for both rhizotrons. Abundance of 16S rRNA genes and transcripts was significantly higher in planted than unplanted rhizotron and plant effect was mainly detected at 12 (T2) and 22 days (T4). No plant effect was observed on fungal abundance, and abundance of 18S rRNA genes and transcripts tended to be constant in unplanted and planted rhizotrons.

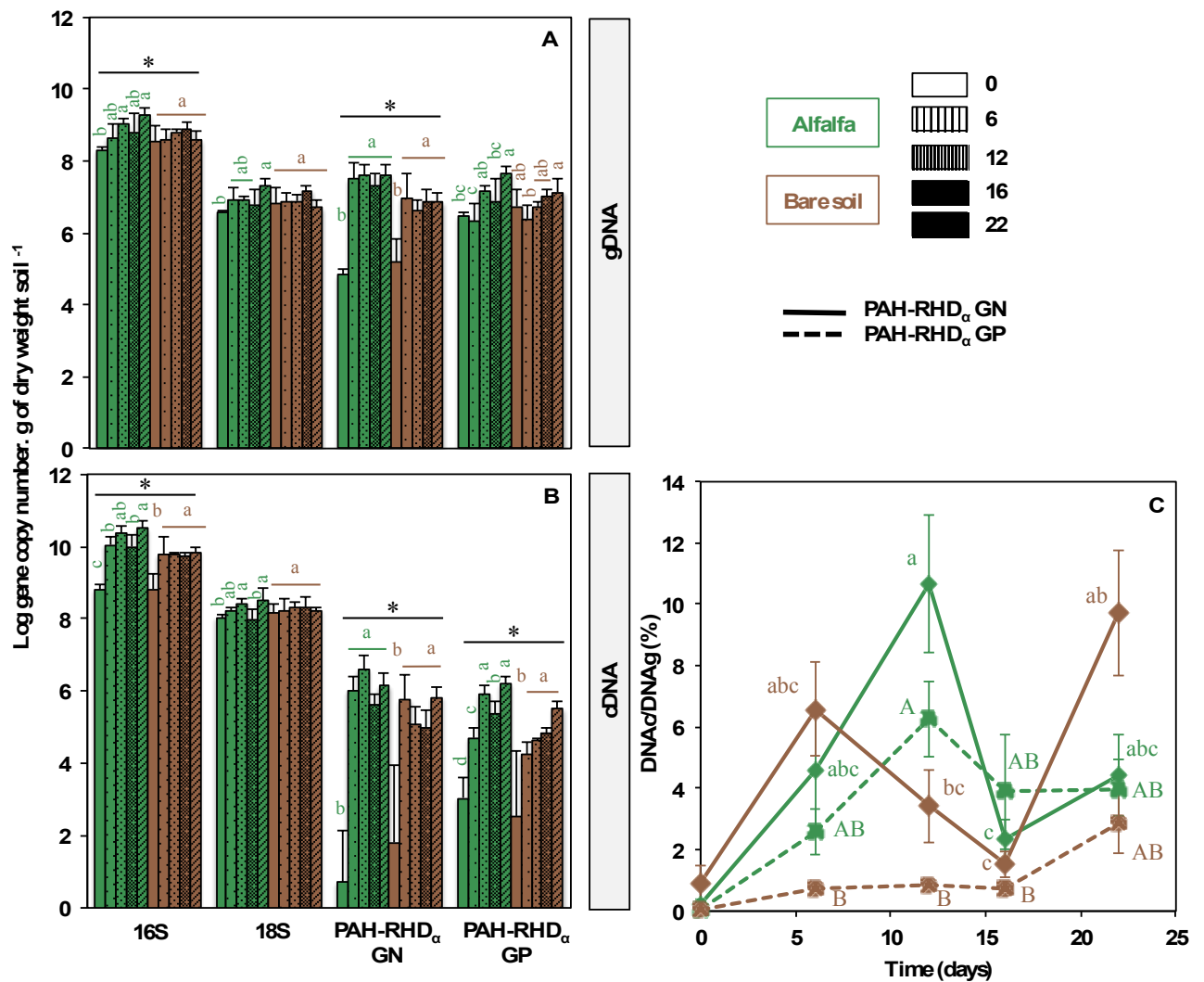


Figure 5.5. Abundance values of genes (A) and transcripts (B) and ratio of transcripts relative to their corresponding genes (C) for fungal 18S rRNA, bacterial 16S rRNA and PAH-degrading bacterial communities after 6, 12, 16 and 22 days in alfalfa planted (green) and unplanted (brown) soils. Values are means and standard deviations of 3 replicates (T0) and 6 replicates for T1 to T4. The effect of time was evaluated for each condition (planted, unplanted) by using one-way ANOVA ($p < 0.05$) and presence of plant was evaluated between T1 and T4 by using two-way ANOVA ($p < 0.05$) followed by Neuman Keuls post Hoc test. In A and B, different letters indicate significant changes in microbial community abundance depending on time for each condition, black asterisks indicate plant effect. In C, letters indicate cross effect of plant and time on the ratio of transcript relative to gene copies.

Globally, the PAH-dioxygenases belonging to Gram-negative bacteria were significantly ($p < 0.05$, Student t test) more transcribed than the one belonging to Gram-positive bacteria by contrast with similar gene abundance of Gram-negative and Gram-positive PAH-degrading bacterial populations. Abundance of Gram-negative PAH-dioxygenase genes and transcripts increased significantly between T0 and 6 days (T1) in both rhizotrons, and were higher in planted than in unplanted soils, with a significant plant effect after 12 days (**Figure 5 A and B**). Abundance of Gram-positive PAH-dioxygenase genes slightly increased over time whereas transcripts largely increased between T0 and 6 days in unplanted soil and increased more gradually in planted soil, but was globally higher in planted than in unplanted rhizotron, with a significant plant effect observed at each time. The level of PAH-dioxygenase gene transcription was expressed by the ratio: number of transcript relative to gene copies (**Figure 5C**). The level of PAH-dioxygenase gene transcription from Gram-negative bacteria was significantly higher after 12 days than at T0 and then decreased over time in alfalfa planted soil while it fluctuated in unplanted soil. The level of PAH-dioxygenase gene transcription from Gram-positive bacteria follow similar trend and was higher in planted than bare soil, especially at 12 days. Globally, the level of PAH-dioxygenase gene transcription was higher in alfalfa than in unplanted soil specifically after 12 days, and decreased (for Gram-negative bacteria) and stayed constant (for Gram-positive bacteria) over time without significant differences with unplanted soil (**Figure 5C**).

5.4.4 Multivariate analysis

The two axes of the principal component analysis (PCA) explained 59% of total variability (**Figure 5.6**). The F1 axis (explaining 37 % of the variability) separates samples from the T0 to all other sampling times and separated samples according to the presence of plants. The F2 axis (explaining 21.38 % of the variability) separates samples according to time, with T1 at the bottom and T4 on the top of the figure. On the correlation circle, pH increase, the percentage of active and total Gram-positive PAH-degrading bacteria were positively correlated with the presence of plants. PAH content ($\Sigma 13$ PAHs and 2-3, 4 and 5-6 cycles) was negatively correlated to the percentage of Gram-negative PAH-degrading bacteria (**Annexe 5.1**).

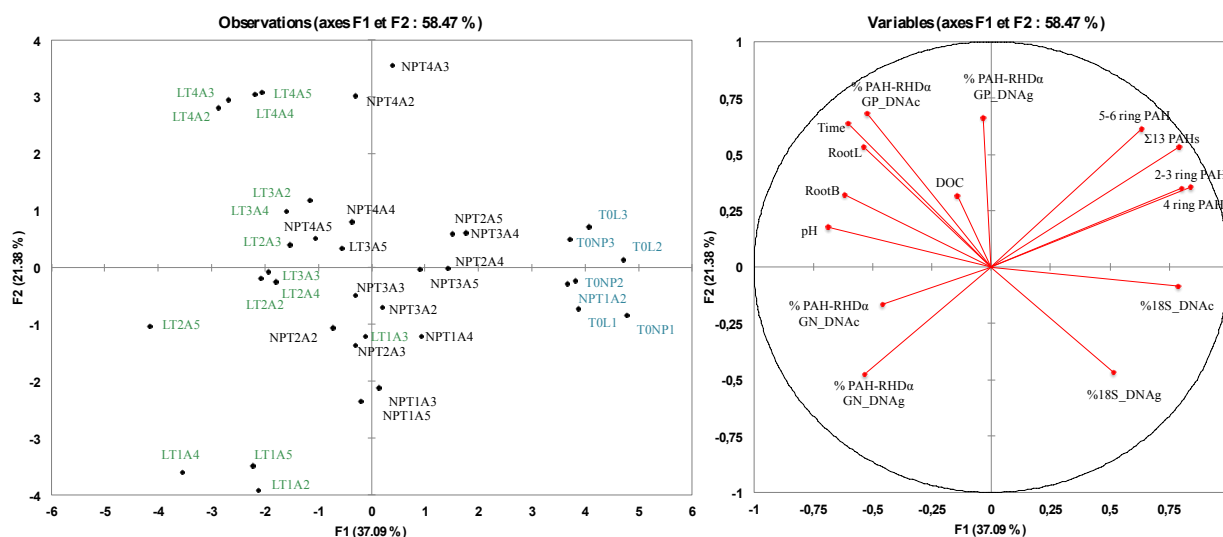


Figure 5.6. Principal component analysis (PCA) and correlation circle generated using time, DOC, pH, percentage (18S rRNA, and PAH-RHD_α GN and GP relative to 16S rRNA genes and transcripts) of total (gDNA) and active (cDNA) communities, root biomass (RootB) and length (RootL), sum of 13 PAH concentrations, 2-3-ring PAHs (fluorene, phenanthrene, anthracene), 4-ring PAHs (fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chryzene), 5-6-ring PAHs (benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene) for the 24 samples (4 replicates (A2 to A5) for each sampling time, T0, T1, T2, T3, T4 corresponding to 0, 6, 12,16 and 22 days) from the alfalfa planted (L) (green) and unplanted (NP) (black) rhizotrons.

5.5 Discussion

5.5.1 PAH dissipation over time

After 6 days of incubation most of the spiked PAH fraction was dissipated in planted and unplanted rhizotrons. A similar rapid dissipation, after few days, of bioavailable PAH was previously observed in simplified sand or soil microcosm spiked with phenanthrene (Cébron et al. 2011b; Louvel et al. 2011), but not with such a complex PAH contamination. At the beginning of the experiment, when roots just started to colonize the rhizotron, soil could be characterized by oligotrophic properties, and PAH compounds were probably the main available carbon sources in planted and unplanted rhizotrons. As microbial community of the aged-contaminated soil from NM coking plant is well adapted to these pollutants (Bourceret et al. 2015), their biodegradation was rapid. Beside PAH degradation oxygenated polar compounds (pPAC) were produced during the first week of the experiment. This kind of bioavailable compounds, previously described in water from industrial wasteland (Rollin et al. 2005; Lundstedt et al. 2006) and in coal tar (Northcott and Jones 2001; Benhabib et al. 2010), could result from biotic PAH degradation. Indeed, Lundstedt et al. (2007) previously described the production of oxygenated compounds during microbial biodegradation. Some

authors suggested that in contaminated soil the apparent pPAC concentration results from the combination between pPAC degradation and pPAC formation from PAH degradation (Biache 2010). Within a week, interesting trends were observed between PAH and oxygenated pPAC, *e.g.* degradation of some high molecular weight PAHs and in the mean time production of pPAC. However, PAH dissipation did not seem to conduct to the production of corresponding oxygenated pPAC, suggesting that pPAC could also result from dissociation of higher molecular weight PAH structures. PAH degradation in 6 days was probably mainly linked to the rapid increase in microbial abundance and activity in the soil, observed between 0 and 6 days for both rhizotrons. The abundance and transcription level of PAH-dioxygenase mainly from Gram negative bacteria increased significantly between T0 and T1 in both rhizotrons, indicating an increase in PAH bacterial degradation potential. Several studies indicated previously that PAH contamination induced an increase and a selection of PAH degraders (Cébron et al. 2008; Zhang et al. 2013b; Sawulski et al. 2014) and an upregulation of the PAH-dioxygenase gene transcription in pure culture (Kim et al. 2006) or complex community (Louvel et al. 2011).

5.5.2 Plant effect

The timescale of the experiment (22 days) allowed to observe the impact of alfalfa on the dynamic of PAH-dissipation and of PAH degrading bacteria in the polluted soil. The presence of alfalfa rapidly increased, within less than two weeks, the abundance of total bacterial community, Gram-negative PAH degrading bacterial population and PAH biodegradation activities as observed through the increase of functional gene transcription. Such an increased abundance of PAH degrading bacteria was also observed in alfalfa rhizosphere in a similar rhizotron experiment after one month (Bourceret et al. in Press), and was also observed by Louvel et al. (2011).

After 6 days of soil incubation, although a significant pH variation indicating a root effect was observed in planted rhizotron, root colonization was probably too low to observe significant differences in PAH concentration and microbial communities between planted and unplanted rhizotron. However, after 12 days, root length was significantly higher than at 6 days, and root biomass and DOC tended to increase, suggesting an increasing rhizosphere effect. At this sampling time, the level of PAH-dioxygenase transcription in both PAH-degrading bacterial populations (GP and GN) increased in alfalfa rhizotron and was significantly higher in planted than in unplanted soil, suggesting a positive impact of the rhizosphere on PAH

degradation activity. In fact the carbon release by roots, and also leached from the top part of the device, can activate PAH degradation by co-metabolism as previously shown by Ambrosoli et al. (2005). Otherwise Cébron et al. (2011b) indicated that the addition of root exudates impacted the density of PAH degraders, although no difference in phenanthrene degradation was observed with or without exudates. Joner et al. (2002) also showed that the addition of N enriched root exudates increased the number of PAH degrading bacteria and increased also PAH dissipation. This phenomenon could be attributed to a priming effect, where the release of labile carbon stimulates microbial density and activity (Haichar et al. 2014), promoting PAH degradation or biotransformation through co-metabolism.

After 12 days, when the PAH concentration was significantly lower in planted than unplanted soil, the level of PAH-dioxygenase gene transcription was also significantly higher in the planted soil. After 16 days of root development, when no further PAH dissipation was observed, a different dynamic was observed between the two PAH-degrading populations. The transcriptional level of PAH-dioxygenase from Gram-negative PAH-degrading bacteria decreased whereas it stayed constant over time for Gram-positive PAH-degrading bacteria, as in unplanted soil. This result suggests that Gram-negative PAH degrading bacteria were the main bacteria involved in the biodegradation or biotransformation of the spiked-PAHs. (Cébron et al. 2009; Cébron et al. 2011b) showed also a decrease with time of this population during PAH degradation. These authors suggested that Gram-negative PAH degrading bacteria, belonging to *Beta* and *Gamma-proteobacteria* and known to be copiotrophes are able to respond quickly to the release of carbon sources that could explain their high abundance at the beginning of the experiment and then their decrease with the decrease of the bioavailable PAH fraction.

5.6 Conclusion

Our results suggest that the dissipation of bioavailable PAHs is very fast in soil, when pollutant represents the main carbon source for microbial communities and PAH degrading bacteria are present. In historically polluted industrial soils with plant cover, despite the release of exudates that could at short-term favor microbial degradation by co-metabolism, the decrease in PAH bioavailability over time could repress degradation activity. Indeed during root development, we showed that PAH-dioxygenase transcription was repressed at the end of the experiment when available PAH concentration was low despite highest dissolved organic carbon content. The plant effect on PAH content and microbial activity was also

observed rapidly (after 12 days), when root growth was sufficient to induce rhizosphere effect and available PAHs were present. The characterization of root exudates and bacterial diversity over time could help to better understand the dynamic of PAH dissipation in the rhizosphere.

5.7 Acknowledgments

This study was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-JSV7-0007_01). The authors thank the GISFI (www.gisfi.fr) for soil providing, David Billet, Geraldine Kitzinger and Gilles Bessaque for technical assistance.

Chapitre 6 :
**Etude de la diversité bactérienne et
fongique d'un sol historiquement contaminé
en présence et en absence de plante**



Dispositif expérimental des parcelles lysimétriques sur le site du GISFI (Homécourt, 54)

Lors des études en rhizotron, nous avons observé que dans le sol NM historiquement contaminé en HAP, la biodégradation des HAP disponibles était très rapide puisque la majeure partie des HAP ajoutés initialement a été dégradée en 1 semaine. Sur une courte période (12 jours), nous avons montré que la présence de plantes favorisait la dégradation des HAP en comparaison avec un sol nu. Enfin, le développement des végétaux a induit une modification de la diversité, de l'abondance et de l'activité microbienne, détectable en quelques jours et jusqu'à quelques semaines. Nous nous sommes donc interrogées sur le devenir à plus long terme des HAP historiques quand la part de HAP disponibles a disparu ou est très faible, et sur l'évolution de la diversité bactérienne dans ce type de sol historiquement contaminé où les communautés microbiennes ont pu s'adapter à la contamination.

Ce dernier chapitre présente donc une étude *in situ* de l'évolution temporelle de la diversité et de l'abondance fongique et bactérienne au cours de l'atténuation naturelle, en présence ou non d'un couvert végétal, de la contamination du sol NM historiquement contaminé. Sur des prélèvements réalisés à 3 temps différents (T0), après 2 ans (T4), et après 6 ans (T12) sur des parcelles lysimétriques (2 m x 3 m x 0,4 m), installées à Homécourt sur le site de la station expérimentale du GISFI, l'évolution de la diversité microbienne a été suivie au cours du temps par séquençage à haut débit, et mise en relation avec les teneurs en polluants et les modifications des paramètres physico-chimiques du sol.

Au cours de cette étude nous avons montré que le sol NM historiquement pollué présentait une diversité et une richesse microbienne importantes et que les communautés bactériennes et fongiques étaient principalement constituées de *Proteobacteria*, *Actinobacteria* et *Bacteroidetes* et d'*Ascomycota*. Les diversités bactériennes et fongiques étaient plus importantes dans les parcelles plantées que celles sans plante. La structure des communautés a évolué au cours du temps en étant probablement impactée par la modification des teneurs en HAP et de certains paramètres édaphiques (pH, C/N) et surtout par la présence de plante qui augmente l'abondance relative de la plupart des ordres fongiques et des bactéries appartenant aux *Actinomycetales*, *Rhizobiales* et aux *Xanthomonadales*. Bien qu'en 6 ans, une dissipation de 40% des HAP historiques initialement présents ait été observée, la présence de plante semble ralentir cette dégradation en comparaison avec le sol nu. Ces travaux font l'objet d'une publication dans la revue *Microbial Ecology*, référencée dans la suite du manuscrit par Bourceret et al. 2015 (DOI: 10.1007/s00248-015-0682-8).

6. The bacterial and fungal diversity of an aged PAH- and heavy metal-contaminated soil is affected by plant cover and edaphic parameters

Amélia Bourceret^{1,2}, Aurélie Cébron^{1,2,†}, Emilie Tisserant³, Pascal Poupin^{4,5}, Pascale Bauda^{4,5}, Thierry Beguiristain^{1,2}, Corinne Leyval^{1,2}

¹ CNRS, LIEC UMR7360, Faculté des Sciences et Technologies, BP70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

² Université de Lorraine, LIEC UMR7360, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

³ INRA, IAM UMR1136, Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France.

⁴ Université de Lorraine, LIEC UMR7360, Campus Bridoux - Rue du Général Delestraint, 57070 Metz Borny, France.

⁵ CNRS, LIEC UMR7360, Campus Bridoux - Rue du Général Delestraint, 57070 Metz Borny, France.

[†] Corresponding author: aurelie.cebron@univ-lorraine.fr; Phone: (+33) 3 83 68 42 96

Key words: bacteria, fungi, PAH, heavy metals, rhizosphere, 454-pyrosequencing

6.1 Abstract

Industrial wasteland soils with aged PAH and heavy metal contaminations are environments where pollutant toxicity has been maintained for decades. Although the communities may be well adapted to the presence of stressors, knowledge about microbial diversity in such soils is scarce. Soil microbial community dynamics can be driven by the presence of plants, but the impact of plant development on selection or diversification of microorganisms in these soils has not been established yet. To test these hypotheses, aged-contaminated soil samples from a field trial were collected. Plots planted with alfalfa were compared to bare soil plots, and bacterial and fungal diversity and abundance were assessed after 2 and 6 years. Using pyrosequencing of 16S rRNA gene and ITS amplicons, we showed that the bacterial community was dominated by *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* and was characterized by low *Acidobacteria* abundance, while the fungal community was mainly represented by members of the *Ascomycota*. The short-term toxic impact of pollutants usually reduces the microbial diversity, yet in our samples bacterial and fungal species richness and diversity was high suggesting that the community structure and diversity adapted to the contaminated soil over decades. The presence of plants induced higher bacterial and fungal diversity than in bare soil. It also increased the relative abundance of bacterial members of the

Actinomycetales, *Rhizobiales* and *Xanthomonadales* orders and of most fungal orders. Multivariate analysis showed correlations between microbial community structure and heavy metal and PAH concentrations over time, but also with edaphic parameters (C/N, pH, phosphorus and nitrogen concentrations).

6.2 Introduction

The decline of coal-mining activities has left behind large areas of industrial wasteland soils that display high levels of multi-contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals (HMs) (Sandrin and Maier 2003). During the 20th century, industrial facilities such as gas or coking plants caused chronic pollution of soils. After an ageing period, both PAHs and HMs persisted in the environment due to their low availability/mobility and low degradability/reactivity. Thus the high concentrations of pollutants and their toxicity have been exerting a selection pressure on microorganisms for decades. These particular environmental conditions potentially enabled the microbial community to adapt, and favored microorganisms able of using pollutant as carbon source or tolerate pollutant by detoxification mechanisms (Cerniglia and Heitkamp 1989; Peng et al. 2008). This long-term process should lead to the development of a new microbial community diversity after a few decades (Schimel et al. 2007; Paissé et al. 2008). Yet, little is known about the impact of ancient contamination on microbial diversity in such aged multi-polluted soils. Most studies focus on the short-term modifications of microbial diversity following recent contamination events, mainly in laboratory experiments (*i.e.* spiking of unpolluted soils) (Ding et al. 2012; Zhou et al. 2009; Gremion et al. 2004). Environmental conditions and edaphic parameters are components that shape the soil microbial communities (Fierer et al. 2007a). Similarly, chronic pollution could also be an important parameter that can select soil microbial diversity. While the short-term impact of contamination tends to decrease microbial abundance, richness and diversity, we hypothesized that in an aged multi-contaminated soil the microbial community would adapt over time toward a unique and rich diversity pattern (Schimel et al. 2007; Paissé et al. 2008).

Some studies show that vegetation can help to restore contaminated environments. Phytoremediation strategies have been developed based on plants' contribution to the stabilization, extraction and degradation of pollutants (Wenzel 2009). While shaping microbial diversity by stimulating some microbial populations, plant root exudates could favor PAH degradation through rhizodegradation processes (Binet et al. 2000; Corgié et al.

2003; Haritash and Kaushik 2009) and modify HM speciation, mobility and availability (Wenzel 2009) in the rhizosphere. Among different plant species used in rhizoremediation assays, alfalfa is described as tolerant to pollution and interesting for PAH remediation (Sun et al. 2011; Muratova et al. 2003), similarly to other legumes such as red lentil (Kawasaki et al. 2012). A contribution of mycorrhizal colonization of plant roots to PAH dissipation (Joner and Leyval 2001) and HM tolerance (Leyval et al. 1997) has also been shown. There is an effect of plants on soil microbial biomass and diversity because vegetal litter or residues bring complex organic matter into soils (Cébron et al. 2015) and also pose the question of selection or diversification of microorganisms. As most studies focus on one particular microbial function or population, little is known about the impact of plants and the effect of the rhizosphere on bacterial and fungal richness and diversity in multi-contaminated soils. A dramatic shift in the bacterial community structure in the rhizosphere of sunflower in a creosote-contaminated soil was demonstrated in a pot experiment after 90 days in the greenhouse during PAH-degradation (Tejeda-Agredano et al. 2013). Although fungal community dynamic is mainly driven by plants (Thion et al. 2012), the diversity of this microbial community needs to be explored. Overall, as the rhizosphere effect could modify soil parameters and fate of pollutants, there is still a need to study the long-term impact of plants in comparison to bare soil, on shaping the microbial communities during natural attenuation processes of aged multi-contaminated soils.

It is well established that environmental parameters impact microbial community composition (Fierer et al. 2007a). Although bacteria and fungi are in constant interaction in soils (Buée et al. 2009a), these two components of the microbial community have a different ecology (*e.g.* nutrient and carbon source requirement, growth rate...) and respond differently to environmental conditions and stressors. To study the system as a whole, bacterial and fungal diversity must be studied together. To our knowledge, no study has yet evaluated how plants and edaphic parameters drive both fungal and bacterial diversity of a multi-contaminated soil on the long term.

In this context, the aims of our study were to (1) describe the diversity of bacterial and fungal communities in an aged multi-contaminated soil from a former coking plant site (Neuves-Maisons, France), (2) determine the impact of plant development on microbial richness and diversity, (3) characterize the temporal modifications of microbial diversity according to evolution of edaphic parameters over 6 years. To address this issue, we collected soil samples

from a field trial where a long-term plant-assisted natural attenuation experiment was being conducted (Ouvrard et al. 2011). We studied three replicate plots of planted and non-planted soil, sampled at three time-points (0, after 2 and 6 years). We analyzed bacterial and fungal community abundance using real-time quantitative PCR, and diversity using tag-encoded pyrosequencing of the 16S rRNA gene and ITS amplicons, respectively.

6.3 Materials and methods

6.3.1 Site description and sample collection

The field trial, previously described by Ouvrard et al. (2011), was set up in September 2005. Among the 24 plots filled with an aged PAH- and HM-contaminated soil (NM) from a coking plant wasteland (Neuves-Maisons, Meurthe et Moselle, France), only three replicates of two treatments were studied. The bare soil plots (NM-BS) were kept clear of vegetation by hand weeding and the planted plots (NM-Msm) were sown with alfalfa (40 g of seeds of *Medicago sativa* var. Europe *per* plot) in September 2005 and co-inoculated with two mycorrhizal fungal strains (*Glomus mosseae* and *Glomus intra-radices*, recently renamed *Funneliformis mosseae* and *Rhizophagus intraradices* (Schüßler and Walker 2010), commercial inoculum from the Institut für Pflanzenkultur, Germany). The plots were monitored twice a year, in May and September, for 6 years. In September, the alfalfa biomass was cut and dry weight was measured (**Table 6.1**).

Mycorrhizal colonization of roots was determined by Trypan blue staining as described by Koske and Gemma (1989) and notation was performed using the method described in (Trouvelot et al. 1986). Six soil subsamples were collected *per* plot and mixed to obtain one composite soil sample *per* plot. After sieving to 5 mm, 500 g were dried and dedicated to soil characterization, and 50 g were stored at -80°C until DNA extraction. Three sampling dates were studied: samples T0 (September 2005), T4 (September 2007) and T12 (September 2011), i.e. 18 soil samples altogether. Sample characteristics (humidity level, physico-chemical properties, total and extractable heavy metals, and PAH concentrations) were measured at the LAS-INRA laboratory (Arras, France) and are listed in **Table 6.1**.

Table 6.1. Summary of the soil characteristics for the six conditions (mean and standard deviation, n=3). Different letters indicate significant differences (p<0.05) among treatments by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newmans-Keuls multiple comparison test (nd: not determined).

Condition	MsmT0	BST0	MsmT4	BST4	MsmT12	BST12
Sampling date	September 2005		September 2007		September 2011	
Humidity (%)	48.85 ± 7.83 ^b	44.74 ± 10.12 ^b	47.40 ± 5.81 ^b	58.65 ± 6.12 ^{ab}	64.37 ± 5.18 ^a	67.91 ± 3.89 ^a
Biomass of alfalfa (g)	0	0	1693.3 ± 156.3	0	109.0 ± 106.1	0
Mycorrhizal colonization						
Frequency of colonized roots (%)	nd	nd	0	nd	24.6 ± 10.1	nd
Frequency of arbuscules (%)	nd	nd	0	nd	15.6 ± 20.3	nd
N (g/Kg)	2.76 ± 0.14 ^a	2.73 ± 0.17 ^a	2.85 ± 0.07 ^a	2.51 ± 0.09 ^{bc}	2.66 ± 0.04 ^{ab}	2.40 ± 0.02 ^c
C/N	21.5 ± 0.7 ^b	22.2 ± 0.2 ^b	22.5 ± 0.8 ^b	23.5 ± 1.1 ^{ab}	25.4 ± 1.1 ^a	25.5 ± 1.7 ^a
TOC (g/Kg)	59.23 ± 1.45	60.67 ± 4.02	64.13 ± 1.88	59.07 ± 4.68	67.47 ± 2.68	61.27 ± 3.58
Organic matter (g/Kg)	102.33 ± 2.31	105.00 ± 6.93	111.00 ± 3.46	102.17 ± 8.28	117.00 ± 4.58	106.00 ± 6.08
pH	6.72 ± 0.16 ^c	6.96 ± 0.14 ^c	7.15 ± 0.07 ^{bc}	7.26 ± 0.15 ^b	7.47 ± 0.04 ^a	7.59 ± 0.01 ^a
CaCO ₃ (g/Kg)	14.83 ± 1.35 ^{ab}	18.40 ± 1.85 ^a	10.92 ± 1.29 ^b	13.93 ± 2.46 ^{ab}	10.10 ± 0.53 ^b	14.47 ± 3.86 ^{ab}
Available P ₂ O ₅ (Olsen) (g/Kg)	0.040 ± 0.004 ^b	0.048 ± 0.003 ^{ab}	0.055 ± 0.006 ^a	0.058 ± 0.009 ^a	0.055 ± 0.006 ^a	0.061 ± 0.007 ^a
Extractable metal (mg/Kg)						
Cu	10.28 ± 1.78 ^c	9.85 ± 0.21 ^b	12.03 ± 1.10 ^b	12.70 ± 0.50 ^b	13.03 ± 0.06 ^b	15.47 ± 0.23 ^a
Fe	82.00 ± 3.76 ^b	82.30 ± 4.71 ^b	97.00 ± 8.72 ^a	101.10 ± 4.25 ^a	99.83 ± 0.29 ^a	107.00 ± 3.00 ^a
Mn	435.33 ± 19.40 ^a	359.00 ± 73.75 ^b	126.00 ± 9.54 ^c	72.20 ± 6.39 ^c	64.40 ± 2.01 ^c	73.37 ± 2.97 ^c
Zn	242.67 ± 3.79 ^a	242.67 ± 9.07 ^a	152.67 ± 16.01 ^c	170.67 ± 7.64 ^{bc}	154.33 ± 8.50 ^c	188.67 ± 16.20 ^b
Metal (mg/Kg)						
B	9.2 ± 0.2 ^a	8.5 ± 0.3 ^b	5.4 ± 0.0 ^d	6.0 ± 0.2 ^c	3.8 ± 0.3 ^e	3.6 ± 0.1 ^e
Cr	658.7 ± 51.9 ^b	648.3 ± 23.5 ^b	783.7 ± 40.5 ^b	767.7 ± 84.1 ^b	1012.3 ± 61.9 ^a	1033.3 ± 75.1 ^a
Cu	140.7 ± 14.2 ^{ab}	131.0 ± 5.6 ^b	157.3 ± 4.2 ^a	147.0 ± 2.0 ^{ab}	146.7 ± 3.5 ^{ab}	146.3 ± 6.7 ^{ab}
Zn	1926.7 ± 55.1 ^b	2000.0 ± 187.3 ^b	2306.7 ± 20.8 ^{ab}	2300.0 ± 226.1 ^{ab}	2196.7 ± 40.4 ^{ab}	2416.7 ± 223.7 ^a
Pb	441.0 ± 5.6 ^c	451.0 ± 35.3 ^c	610.3 ± 19.5 ^a	596.0 ± 32.1 ^a	491.7 ± 6.4 ^{bc}	545.3 ± 56.0 ^{ab}
Σ16 PAH (US-EPA) (mg/kg)	1870.6 ± 146.5 ^a	1839.1 ± 262.3 ^a	2002.0 ± 100.5 ^a	1281.8 ± 314.2 ^b	1333.3 ± 57.7 ^b	1133.3 ± 152.8 ^b

6.3.2 DNA extraction

Total genomic DNA was extracted from 0.5 g wet weight of each of the 18 soil samples with the FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Illkirch, France), and resuspended in 100 μ l of DES (Dnase-Free water). DNA concentrations and quality (purity ratio A_{260}/A_{280}) were measured using a spectrophotometer (UV1800, Shimadzu) equipped with a TrayCell unit (Hellma).

6.3.3 Assessment of fungal and bacterial abundance by real-time quantitative PCR

Real-time quantitative PCR was performed as previously described in Cébron et al. (2008) and Thion et al. (2012a). Primer sets FF390R (5'-GAGGTCTCGTTCGTTATCG-3') / Fung5F (5'-GGGAACCAGGACTTTTAC-3') (Lueders et al. 2004) and 968F (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') / 1401R (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3') (Felske et al. 1998) were used to quantify fungi and bacteria by targeting the 18S rRNA and 16S rRNA genes, respectively. Amplification reactions (20 μ l) were carried out using 1 μ l of ten-fold diluted DNA (corresponding to 2.8 to 6.5 ng), 10 μ l of iQ SYBR Green SuperMix (Bio-Rad), 0.8 μ l of each primer (10 μ M), 0.4 μ l of Bovine Serum Albumin (3%), 0.2 μ l of Dimethylsulfoxide, and 0.08 μ l of T4gp32 (500 μ g/ml) (MP Biomedicals). Quantification was performed using a CFX96 Real-Time PCR detection system (Bio-Rad) and standard plasmid dilution series from 10^8 to 10^1 copies μ l⁻¹. Data were then expressed as gene copy numbers *per* gram of dry weight soil after data correction using soil sample humidity values.

6.3.4 PCR and pyrosequencing

The primer set 515F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3') / 907R (5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3') (Turner et al. 1999) was used to amplify the V4-V5 region of bacterial 16S rRNA genes and the primer set ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes and Bruns 1993) / ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (White et al. 1990) was used to amplify the ITS1 (Internal Transcribed Spacer) region of fungal rRNA genes. Primers were combined at the 5' end with a MID (Multiplex Identifier, Roche) corresponding to a sequence of 10 sample-specific nucleotides. The PCR mixture (50 μ l) contained 5X Taq-&Go™ ready to use PCR Mix (MP Biomedicals), 10 pM of each primer, and 2 μ l of ten-fold diluted template DNA (or 2 μ l of sterile water for the negative control). Five independent PCR reactions were performed for each sample. The PCR conditions were 94°C for 5 min; 30 cycles of 94°C for 30 s, 55°C

or 50°C for 1 min, 72°C for 1 min, followed by 72°C for 10 min for primers 515F/907R or ITS1F/ITS2, respectively. PCR efficiency was checked by agarose gel electrophoresis (1%) and visualized after ethidium bromide staining under UV light with a GelDoc XR transilluminator (Bio-Rad).

The five independent PCR products were pooled, purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, France) and DNA was quantified by using a spectrophotometer (UV1800, Shimadzu) equipped with a TrayCell unit (Hellma) and by visualization and comparison with a mass ladder (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) on 1% agarose gels as described above. Two equimolar mixes (multiplexed samples) from the 18 samples, one for 16S rRNA genes and one for ITS amplicons, were prepared in 50 µl to reach a total concentration of 40 ng/µl. Pyrosequencing was performed by Beckman Coulter Genomics (Danvers, MA, USA) using a 454/Roche GS-FLX Titanium system.

6.3.5 Analysis of 16S rRNA genes and ITS pyrosequencing data

6.3.5.1 *Bacterial community analysis*

Ribosomal Database Project (RDP, (Wang et al. 2007)) pyrosequencing pipeline was used for filtering and trimming of 16S rRNA gene reads based on sff-files. The presence of both forward and reverse primers (max. edit distance of 2) was checked to recover sense and anti-sense sequences. At the end, 482,163 reads passed the length (longer than 300 bp) and quality criteria (exclusion a reads with unresolved nucleotides and a low average quality score below 20) before being distributed into 18 samples according to their MIDs, the 16S rRNA gene reads were filtered and trimmed according to different criteria. Mothur 1.29.2 program (Schloss et al. 2009) was used following previously described analyses steps (Sogin et al. 2006). Alignment of bacterial sequences used the SILVA database as a template. Based on distance matrix generation, the sequences were clustered and OTU (Operational Taxonomic Unit) were formed to 97% sequence similarity. To compare all sample conditions, a sub-sampling to 18,100 sequences per sample was performed. Finally, the taxonomic affiliation was obtained using the RDP database as a template.

6.3.5.2 *Fungal community analysis*

For the fungal community, 360,477 quality reads of ITS were obtained from the Mothur-based pipeline previously described by Coince et al. (2013). The fungal ITS sequences were distributed into 18 samples according to their MIDs, the reads were cleaned in Mothur 1.20.1

with the default parameters (Schloss et al. 2009). ITS1 was extracted by using Fungal ITS extractor version 2 (Nilsson et al. 2010) and a filtration step by length (> 100 bp) was performed. Quality ITS reads were aligned and clustered into OTUs (97% similarity) and consensus sequences were generated by using Uclust version 3.0 (parameter $iddef = 2.97\%$ similarity). Then sub-sampling to 9,100 sequences per sample was performed. Consensus sequences were assigned against the UNITE database by using the Basic Local Alignment search Tool algorithm Blastn version 2.2.2.3 (Altschul et al. 1990).

6.3.5.3 Diversity analysis

Rarefaction curves were obtained using the Analytic Rarefaction 2.0 tool (Hunt Mountain Software); richness and diversity indices were calculated using EstimateS 9.1.0 (Colwell 2013). The sequence data generated in this study were deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) and are available under the BioProject ID: PRJNA269565 and PRJNA269566 for bacteria and fungi, respectively

6.3.6 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using XLStat2012 software (Addinsoft). A two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Newman-Keuls post-hoc test was performed to determine statistical differences ($p < 0.05$) in the microbial communities among the six conditions, depending on time and the presence of a plant cover. Canonical correspondence analysis (CCA) followed by a Monte Carlo permutation test (1000 permutations) in XLStat-ADA 2015 (Addinsoft) was used to evaluate the relationship between environmental factors (plant biomass, Log_{10} of bacterial and fungal abundances obtained through qPCR and edaphic characteristics that were significantly different (ANOVA, $p < 0.05$) between samples). Two-dimensional hierarchical clustering was performed on standardized data set (z-score) of the most abundant ($> 2\%$ in at least one sample) bacterial and fungal OTUs (affiliation at 97% similarity; i.e. 24 bacterial and 37 fungal OTUs) in the three replicates of the six conditions. This was performed within the XLStat2011-Omics package (Addinsoft). Both samples and OTUs were clustered with Ascending Hierarchical Classification based on distance metric (euclidian), generating dendrograms. Heat maps were reordered by dendrogram clustering to relocate covarying OTUs and samples.

6.4 Results

6.4.1 Evolution of soil characteristics with time and plant colonisation

The edaphic parameters of the NM soil evolved over time as described in **Table 6.1**. Over the six years, pH values, C/N, available phosphorous, and humidity increased (or were higher at T12), while PAH concentrations, extractable Mn and Zn decreased with time, and total metal concentration remained unchanged.

6.4.2 Bacterial and fungal abundance

Over time, bacterial abundance (mean value of $1.69 \times 10^9 \pm 0.58 \times 10^9$ 16S rRNA gene copies g dw soil⁻¹) was about ten-fold higher than fungal abundance (mean value of $2.14 \times 10^8 \pm 0.15 \times 10^8$ 18S rRNA gene copies g dw soil⁻¹; **Figure 6.1**).

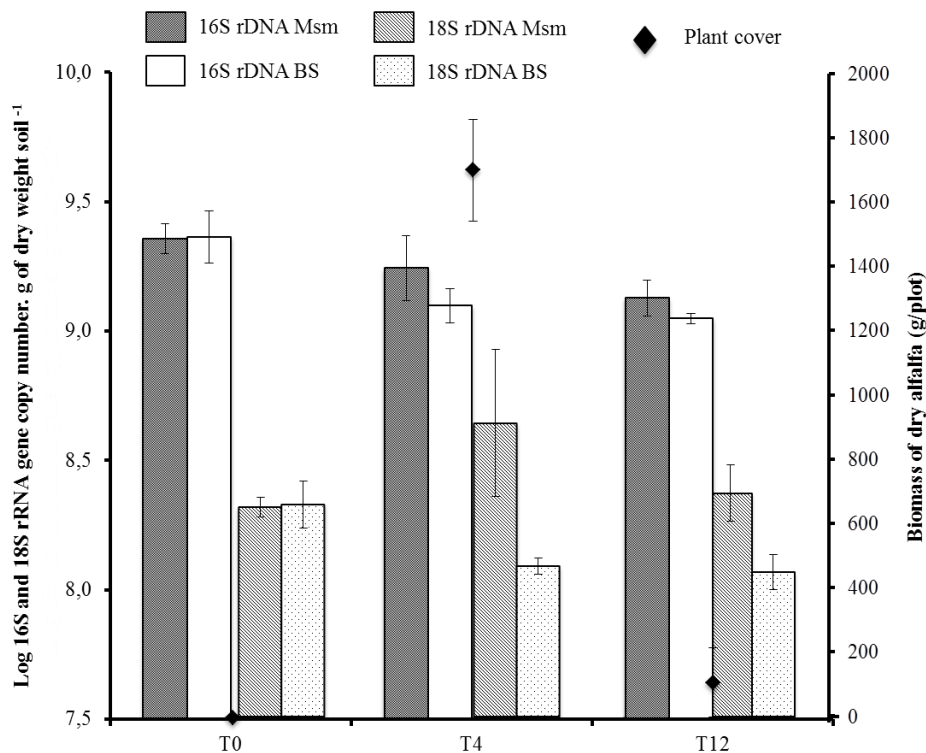


Figure 6.1. Abundance of fungal and bacterial (18S and 16S rRNA gene copy numbers) communities and alfalfa biomass over time (T0: September 2005, T4: September 2007 and T12: September 2011) for the two BS (bare soil) and Msm (planted with *Medicago sativa* and inoculated with mycorrhizal fungi) treatments. Different letters indicate significant differences among plots ($p < 0.05$) resulting from a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Neuman-Keuls multiple comparison test; abc, AB and A'B' refer respectively to statistics on 16S rRNA gene copy numbers. g of dry weight soil⁻¹, 18S rRNA gene copy numbers. g of dry weight soil⁻¹ and alfalfa biomass.

Bacterial abundance was significantly higher ($p < 0.05$) at T0 and then decreased with time. Conversely, fungal abundance remained constant over time. In the Msm plots, no colonization of roots by mycorrhizal fungi was observed at T4, while the frequency of mycorrhizal roots reached 24% at T12 and arbuscules were observed (**Table 6.1**). The presence of vegetation had no impact on bacterial abundance, while it enhanced fungal abundance: it was significantly higher ($p < 0.05$) in MsmT4 samples when the biomass of alfalfa colonizing the Msm plots reached its highest value ($1693 \pm 156 \text{ g plot}^{-1}$; **Figure 6.1**). Consequently, the ratio fungi to bacteria was higher in MsmT4 soil compared to the other samples.

6.4.3 Bacterial and fungal richness and diversity

After filtering steps, 88% and 82% of 16S rRNA genes and ITS reads were kept for further analyses (**Table 6.2**). The rarefaction analysis revealed that plateau levels were not reached in any of the samples (Supplementary Figure S1). Based on complete data, we found ten times more OTUs for the bacterial ($1,963$ to $3,057 \text{ OTUs g dw soil}^{-1}$) than for the fungal community (284 to $592 \text{ OTUs g dw soil}^{-1}$; **Table 6.2**). Similarly, the Chao1 estimator of OTU richness predicted a ten-fold higher richness for the bacterial community (mean of 6,350 estimated species at T0) as compared to the fungal community (mean of 463 estimated species at T0; **Table 6.2**). Bacterial richness was neither influenced by the presence of a plant cover or by time (**Table 6.2 and Annexe 6.1**). By contrast, fungal richness increased significantly ($p < 0.05$) with time and was significantly higher ($p < 0.05$) under the MsmT4 condition (**Table 6.2**). The Shannon and inverse of Simpson indices of bacterial and fungal diversity increased significantly ($p < 0.05$) with time and with the presence of plants at MsmT4, as well as at T12 for fungi (**Table 6.2**).

Table 6.2. Pyrosequencing data characteristics, and richness and diversity estimators (3% cutoff) of the bacterial and fungal communities in the six different conditions (means and standard deviations, n=3): BS (Bare soil) and Msm (planted with *Medicago sativa* and inoculated with mycorrhizal fungi) at three time-points (T0: setting up, T4: after 2 years and T12: after 6 years). We created OTUs based on 97% sequence similarity (OTU₉₇) and randomly subsampled 16S rRNA genes and ITS data to 18,100 and 9,100 reads *per* sample. A two-way analysis of variance (ANOVA, p<0.05) followed by Newman-Keuls multiple comparison test was performed on richness and diversity estimator data to determine statistical differences (lowercase) between treatments.

	Conditions	Numbers of reads		Richness estimator		Diversity estimator	
		Raw data	Filtered data	Observed OTU ₉₇	Chao1	Shannon's index (H')	Inverse of Simpson's index (1/D)
16S	MsmT0	28922 ± 549	25784 ± 637	2658 ± 735	8173 ± 3599	5.46 ± 0.25 ^b	31.13 ± 8.04 ^c
	MsmT4	25205 ± 4287	21958 ± 3832	3057 ± 435	8433 ± 2061	6.38 ± 0.19 ^a	180.74 ± 24.73 ^a
	MsmT12	32767 ± 2910	28822 ± 2354	2754 ± 760	7301 ± 3622	6.22 ± 0.23 ^a	128.61 ± 11.77 ^b
	BST0	31608 ± 5355	27725 ± 4406	1963 ± 528	4527 ± 1931	5.45 ± 0.24 ^b	38.92 ± 10.08 ^c
	BST4	30640 ± 1828	26994 ± 1301	2402 ± 803	5610 ± 3373	6.06 ± 0.26 ^a	123.89 ± 6.03 ^b
	BST12	32736 ± 4867	29439 ± 4449	2762 ± 222	7136 ± 1228	6.10 ± 0.11 ^a	104.52 ± 14.24 ^b
	<i>Total of sequences</i>	<i>545631</i>	<i>482163</i>				
ITS	MsmT0	23887 ± 3613	19837 ± 2666	284 ± 26 ^c	452 ± 89 ^b	2.90 ± 0.18 ^c	7.20 ± 1.23 ^b
	MsmT4	26700 ± 13721	21722 ± 10983	592 ± 69 ^a	995 ± 157 ^a	4.20 ± 0.25 ^a	35.91 ± 19.50 ^a
	MsmT12	27495 ± 3256	22867 ± 2716	563 ± 80 ^a	977 ± 115 ^a	4.01 ± 0.27 ^a	16.39 ± 3.96 ^{ab}
	BST0	21020 ± 1517	17336 ± 868	294 ± 27 ^c	474 ± 117 ^b	2.98 ± 0.05 ^c	7.79 ± 0.28 ^b
	BST4	20951 ± 6250	16889 ± 4907	441 ± 11 ^b	728 ± 9 ^a	3.22 ± 0.10 ^c	7.21 ± 0.32 ^b
	BST12	26111 ± 3932	21508 ± 3276	519 ± 28 ^{ab}	847 ± 138 ^a	3.57 ± 0.10 ^b	18.39 ± 14.15 ^{ab}
	<i>Total of sequences</i>	<i>438492</i>	<i>360477</i>				

Taxonomic assignment of OTUs allowed us to identify at least 17 bacterial phyla and 5 fungal phyla (Figure 6.2). The bacterial community was mainly composed of *Proteobacteria* ($57.4 \pm 13.4\%$), *Actinobacteria* ($13.2 \pm 7.7\%$), *Bacteroidetes* ($6.0 \pm 1.9\%$) and unclassified bacteria ($2.4 \pm 1.0\%$). *Proteobacteria* were dominated by members of the *Gamma-* ($21.3 \pm 8.8\%$), *Alpha-* ($19.0 \pm 1.5\%$) and *Beta-Proteobacteria* ($15.0 \pm 6.4\%$) classes. The fungal community was mainly composed of *Ascomycota* ($53.6 \pm 9.4\%$), unclassified fungi ($41.3 \pm 8.2\%$) and *Basidiomycota* ($4.2 \pm 5.2\%$).

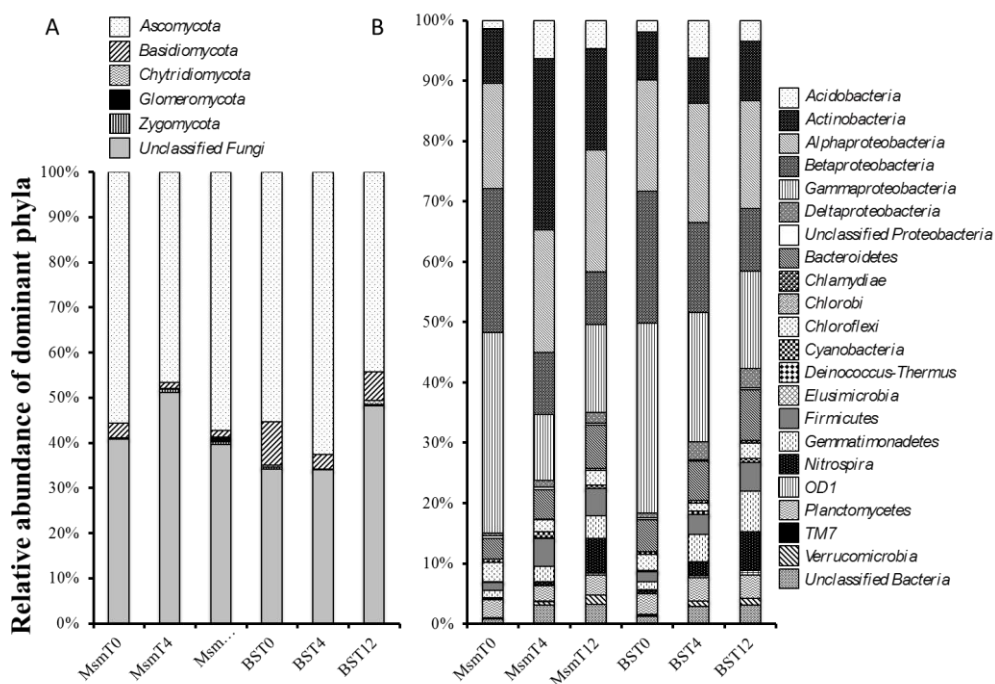


Figure 6.2. Relative abundance of the dominant (represented by more than 10 sequences) fungal and bacterial phyla in the six conditions (means of 3 replicates).

We found 24 and 37 dominant bacterial and fungal OTUs, represented by at least 2% of the sequences for at least one sample (Figure 6.3). They accounted for $28.6 \pm 7.5\%$ and $67.9 \pm 3.3\%$ of the bacterial 16S rRNA genes and fungal ITS sequences, respectively. At T0, the bacterial community was dominated by OTU11 affiliated to the *Thiobacillus* genus (*Beta-Proteobacteria*) and the fungal community was dominated by two OTUs affiliated to the *Talaromyces* and *Scedosporium* genera (*Ascomycota*) and by a third OTU affiliated to unclassified fungi.

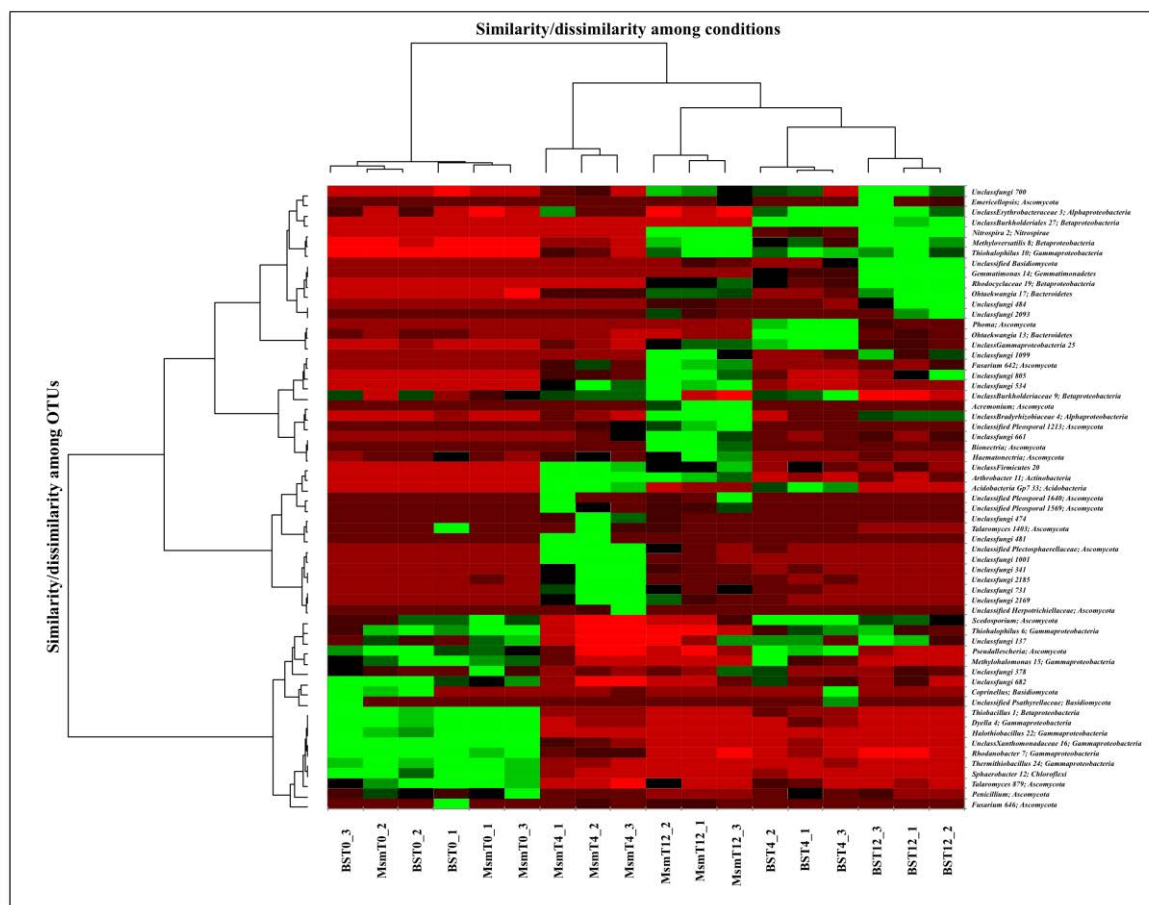


Figure 6.3. Clustering analysis generating double dendrograms (vertically: OTUs dendrogram and horizontally: sample conditions dendrogram) and heat map representation reflecting data values of the most abundant (>2% in at least one sample) bacterial and fungal OTUs in the six conditions (affiliation at 97% similarity). The relative abundance of 24 bacterial and 37 fungal OTUs were normalised (z-score) to compare studied conditions (3 replicates per condition).

6.4.4 Modification of bacterial and fungal diversity over time

The relative abundance of some bacterial phyla significantly ($p < 0.05$) increased (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *OD1*, *Gemmatimonadetes*, *Verrucomicrobia*) or decreased (*Gamma-Proteobacteria*, *Beta-Proteobacteria*) over time, while others were specifically increased at T4 (*Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Alpha-Proteobacteria*) (Figure 6.2). The relative abundance of *Glomeromycota* phylum increased significantly ($p = 0.007$) at T12 (Figure 6.2). Moreover, the relative abundance of two orders belonging to the *Ascomycota* (*Hypocreales* and *Pleosporales*) increased significantly ($p = 0.062$ and $p = 0.009$) over time. On the contrary, the relative abundance of *Eurotiales* decreased significantly ($p < 0.001$) over time.

Clustering of samples according to the dominant OTUs (horizontal dendrogram, **Figure 6.3**) showed higher similarity between samples at T0 than between samples at the two other times. This clustering of T0 samples is mainly due to 19 OTUs, mostly belonging to bacteria (**Figure 6.3**). The relative abundance of 12 bacterial and 10 fungal OTUs increased significantly ($p < 0.05$) over time (**Figure 6.3 and Annexe 6.2**). The 12 bacterial OTUs were affiliated to one *Actinobacteria* (*Arthrobacter*), one *Bacteroidetes* (*Ohtaekwangia*), one unclassified *Firmicute*, one *Gemmatimonadetes* (*Gemmatimonas*), one *Nitrospirae* (*Nitrospira*), two *Alpha-Proteobacteria* (unclassified *Erythrobacteraceae* and unclassified *Bradyrhizobiaceae*), three *Beta-Proteobacteria* (*Rhodocyclaceae*, *Methyloversatilis* and unclassified *Burkholderiales*), and two *Gamma-Proteobacteria* (unclassified and *Thiohalophilus*). The 10 fungal OTUs were affiliated to 5 different genera: 3 were affiliated to the *Ascomycota* phylum, the *Pezizomycotina* subphylum and the *Sordariomycetes* class (*Acremonium*, *Bionectria*, *Fusarium*), one belonged to unclassified *Basidiomycota*, and one was affiliated to unclassified fungi.

The relative abundance of 2 bacterial OTUs affiliated to the *Acidobacteria* Gp7 and *Ohtaekwangia* genera (*Bacteroidetes*) and of 7 fungal OTUs affiliated to *Phoma*, unclassified *Plectosphaerellaceae* and unclassified fungi, increased significantly at T4 (**Figure 6.3 and Annexe 6.2**). The relative abundance of 9 bacterial and 3 fungal OTUs decreased significantly ($p < 0.05$) over time (**Annexe 6.2**). Seven of these bacterial OTUs were affiliated to *Gamma-Proteobacteria* and belonged to the orders *Acidithiobacillales* (*Thermithiobacillus*), *Chromatiales* (*Thiohalophilus*, *Halothiobacillus*), *Xanthomonadales* (unclassified *Xanthomonadaceae*, *Dyella*, *Rhodanobacter*), *Methylohalomonas* or unclassified *Gamma-Proteobacteria*, one was affiliated to *Chloroflexi* (*Sphaerobacter*) and one to *Beta-Proteobacteria* (*Thiobacillus*). The 3 fungal OTUs belonged to the *Ascomycota* phylum, *Pezizomycotina* subphylum and *Eurotiomycetes* (*Talaromyces*) or *Sordariomycetes* (*Pseudallescheria*) class, and one was affiliated to unclassified fungi (**Figure 6.3**).

6.4.5 Modification of bacterial and fungal diversity with the presence of plant

Clustering of samples according to the dominant OTUs (horizontal dendrogram, **Figure 6.3**) showed high similarities in planted soils and between bare soils at T4 and T12. Clustering of the dominant OTUs (vertical dendrogram, Figure 3) showed that plant development increased the relative abundance of 15 and 11 OTUs, at T4 and T12 respectively, mainly belonging to fungi. The relative abundance of other bacterial OTUs was increased in bare soil (**Figure 6.3**

and Annexe 6.2). The relative abundance of some bacterial phyla increased significantly ($p < 0.05$) (*Actinobacteria*) or decreased (*Bacteroidetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Gamma-Proteobacteria*, *OD1*, *Gemmatimonadetes*) with the presence of plants. Concerning fungal phyla, the relative abundance of *Zygomycota* and *Glomeromycota* increased significantly in alfalfa-planted plots ($p < 0.05$). Moreover, the fungal order *Microascales* was significantly ($p < 0.001$) less represented in planted soils (**Figure 6.3**).

The relative abundance of 5 bacterial and 10 fungal OTUs increased significantly ($p < 0.05$) with the presence of plants (**Figure 6.3 and Annexe 6.2**). These bacterial OTUs were affiliated to one *Actinobacteria* (*Arthrobacter*), one unclassified *Firmicute*, one *Alpha-Proteobacteria* (unclassified *Bradyrhizobiaceae*) and two *Gamma-Proteobacteria* belonging to the *Xanthomonadaceae* family (unclassified and *Dyella*). Among the fungal OTUs, four belonged to the *Sordariomycetes* class among the *Pezizomycotina* subphylum (*Acremonium*, *Bionectria*, and *Fusarium* and unclassified *Plectosphaerellaceae*), and the other six were unclassified. The relative abundance of 6 bacterial and 5 fungal OTUs decreased significantly ($p < 0.05$) with the presence of plants (**Annexe 6.2**). These bacterial OTUs were affiliated to one *Bacteroidetes* (*Ohtaekwangia*), one *Gemmatimonadetes* (*Gemmatimonas*), one *Nitrospiraea* (*Nitrospira*), one *Alpha-Proteobacteria* (unclassified *Erythrobacteraceae*), and two *Beta-Proteobacteria* (unclassified *Rhodocyclaceae* and *Burkholderiales*). Three fungal OTUs belonged to the *Sordariomycetes* (*Phoma*, *Pseudallescheria*, *Scedosporium*) and two to unclassified fungi (**Figure 6.3**).

6.4.6 Multivariate analysis

A Canonical correspondence analysis (CCA) was used to evaluate which variables best explained the microbial community compositions (**Figure 6.4**). CCA ordination of bacterial and fungal taxons (relative abundance at the order level) and environmental variables (plant biomass, microbial abundance and edaphic characteristics of the samples) depict relationships between the different plots and sampling dates. The first 2 CCA axes explained 69.63% of the total variance in the microbial diversity data (**Figure 6.4**).

The six T0 samples grouped together and were separated from the other samples on the 1st axis (F1) discriminating the samples according to the effect of time. These T0 samples were discriminated according to higher bacterial abundance (16S), higher total calcium carbonate concentration, and higher extractable zinc concentration. At T4, the three samples from the

planted plots MsmT4 were clearly separated from the BST4 samples on the 2nd axis (F2) discriminating the samples according to the presence of plants, higher total N content and fungal abundance (18S). At T12, although the samples were still discriminated, the difference between the Msm and BS plots was thinner. T12 samples were discriminated according to higher total metal contents, extractable Fe and Cu, higher pH, C/N ratio and available phosphorous. At T0, four bacterial orders belonging to *Gamma-proteobacteria* (*Chromatiales*), *Beta-proteobacteria* (*Acidithiobacillales* and *Hydrogenophilales*) and *Elusimicrobia* phyla (*Elusimicrobiales*) and one fungal order (*Sporidiobolales*) belonging to *Basidiomycota* were the most correlated with high extractable Zinc concentration, high CaCO₃ and high bacterial abundance.

Over 6 years part of the microbial community was modified and more affected by changes in edaphic parameters. At T12, five bacterial orders belonging to five different phyla: *Nitrospirae* (*Nitrospirales*), *Verrucomicrobia* (*Puniceicoccales*), *Actinobacteria* (*Euzebyales*), *Acidobacteria* (Unclassified *Acidobacteria_GPI6*), and *Chloroflexi* (Unclassified *Thermomicrobia*), and two fungal orders: Unclassified *Glomeromycota*, and Unclassified *Basidiomycota*, were highly correlated with higher C/N ratio, higher pH, higher P₂O₅, higher extractable iron and copper content and higher zinc and chrome concentrations. Moreover, seven bacterial orders belonging to five different phyla: *Actinobacteria* (*Solirubrobacterales* *Thermoleophilales*), *Chloroflexi* (Unclassified *Chloroflexi*), *Acidobacteria* (Unclassified *Acidobacteria_GPI0*), *Planctomycetes* (Unclassified), and *Firmicutes* (Unclassified), were highly correlated with higher copper and lead concentrations.

At T4, most fungal orders were positively correlated to alfalfa biomass and to the higher fungal abundance. Among these seven orders, six belong to the Ascomycota phylum and *Pezizomycotina* sub-phylum and belong to four different classes: *Dothideomycetes* (*Capnodiales*), *Eurotiomycetes* (*Onygenales*), *Leotiomycetes* (*Helotiales*, *Thelebolales*), and *Sordariomycetes* (*Chaetosphaeriales*, and Unclassified *Hypocreomycetidae*), and one to the *Basidiomycota* phylum (*Tremellales*).

Figure 6.4. Canonical correspondence analysis (CCA) ordination of bacterial (in green) and fungal (in blue) taxa (relative abundance of the dominant orders represented by more than 10 sequences), and environmental variables (abundance of fungal 18S and bacterial 16S rRNA gene copy numbers, biomass of dry alfalfa and edaphic characteristics (in red), showing the relationships between the different plots and sampling dates (3 replicates of the 6 conditions, in black bold type). Numbers in *Italic* correspond to the quantity of OTUs that belong to the taxon. Fungal and bacterial orders: *Acidi.*: *Acidimicrobiales*, *Acidithio.*: *Acidithiobacillales*, *Actinomyc.*: *Actinomycetales*, *Altero.*: *Alteromonadales*, *Bacill.*: *Bacillales*, *Bdello.*: *Bdellovibrionales*, *Burkhol.*: *Burkholderiales*, *Caldi.*: *Caldilineales*, *Capno*: *Capnodiales*, *Caulo.*: *Caulobacterales*, *Chaetos.*: *Chaetosphaeriales*, *Chlamy.*: *Chlamydiales*, *Chroma.*: *Chromatiales*, *Clostri.*: *Clostridiales*, *Dehalo.*: *Dehalococcoidales*, *Desulfur.*: *Desulfuromonadales*, *Elusi.*: *Elusimicrobiales*, *Euro.*: *Eurotiales*, *Euzeb.*: *Euzebyales*, *Flavo.*: *Flavobacteriales*, *Gemma.*: *Gemmatimonadales*, *Helot.*: *Helotiales*, *Hydrogeno.*: *Hydrogenophilales*, *Hypo.*: *Hypocreales*, *Lactob.*: *Lactobacillales*, *Legion.*: *Legionellales*, *Methylo.*: *Methylococcales*, *Microasc.*: *Microascales*, *Mortier.*: *Mortierellales*, *Myxoc.*: *Myxococcales*, *Nitro.*: *Nitrospirales*, *Nitroso.*: *Nitrosomonadales*, *Oceano.*: *Oceanospirillales*, *Onyg.*: *Onygenales*, *Opiu.*: *Opitales*, *Parvu.*: *Parvularculales*, *Pseudo.*: *Pseudomonadales*, *Punicei.*: *Puniceicoccales*, *Rhizo.*: *Rhizobiales*, *Rhodo.*: *Rhodobacterales*, *Rhodocyc.*: *Rhodocyclales*, *Rhodospiri.*: *Rhodospirillales*, *Rickett.*: *Rickettsiales*, *Soliru.*: *Solirubrobacterales*, *Sphaero.*: *Sphaerobacterales*, *Sphingo.*: *Sphingomonadales*, *Sphingobacter.*: *Sphingobacteriales*, *Sporidio.*: *Sporidiobolales*, *Syntro.*: *Syntrophobacterales*, *Theleb.*: *Thelebolales*, *Thermo.*: *Thermoanaerobacterales*, *Thermoleo.*: *Thermoleophilales*, *Thiotric.*: *Thiotrichales*, *Treme.*: *Tremellales*, *Un. Acido_Gp1*: *Unclassified Acidobacteria GP1*, *Un. Acido_Gp10*: *Unclassified Acidobacteria GP10*, *Un. Acido_Gp16*: *Unclassified Acidobacteria GP16*, *Un. Acido_Gp17*: *Unclassified Acidobacteria GP17*, *Un. Acido_Gp3*: *Unclassified Acidobacteria GP3*, *Un. Acido_Gp6*: *Unclassified Acidobacteria GP6*, *Un. Acido_Gp7*: *Unclassified Acidobacteria GP7*, *Un. Actino.*: *Unclassified Actinobacteria*, *Un. Bacteria.*: *Unclassified Bacteria*, *Un. Bacteroid.*: *Unclassified Bacteroidetes*, *Un. Basidio.*: *Unclassified Basidiomycota*, *Un. Chloro.*: *Unclassified Chloroflexi*, *Un. Firmi.*: *Unclassified Firmicutes*, *Un. Fungi*: *Unclassified Fungi*, *Un. Glomero.*: *Unclassified Glomeromycota*, *Un. Hypocre.*: *Unclassified Hypocreomycetidae*, *Un. ODI*: *Unclassified ODI*, *Un. Plancto.*: *Unclassified Planctomycetes*, *Un. Strepto.*: *Unclassified Streptophyta*, *Un. Thermo.*: *Unclassified Thermomicrobia*, *Un. α -proteo.*: *Unclassified Alphaproteobacteria*, *Un. γ -proteo.*: *Unclassified Gammaproteobacteria*, *Un. δ -proteo.*: *Unclassified Deltaproteobacteria*, *Xantho.*: *Xanthomonadales*. Edaphic characteristics: extractable copper, iron, and zinc (Cu ext, Fe ext, and Zn ext, respectively), 16 PAHs (mg/Kg of dry weight soil).

6.5 Discussion

6.5.1 Microbial diversity of the aged multi-contaminated NM soil

The NM soil had a high carbon concentration, neutral pH, low nutrient concentrations and high concentrations of PAHs and heavy metals that explain its low fertility and high toxicity (Ouvrard et al. 2011). This soil represented a unique ecosystem: contamination dated back to ca. 100 years, so selection pressure on soil microorganisms had lasted for decades. While the short-term impact of contamination tends to decrease microbial abundance, richness and diversity, we hypothesized that in such aged multi-contaminated soil the microbial community would adapt over time toward a unique diversity as compared to unpolluted soil. In NM soil, bacteria were approximately ten-fold more abundant than fungi regardless of time or of the presence of vegetation. The same trend was previously observed in the same soil (Cébron et al. 2011a), and in many uncontaminated soils but with a higher difference between bacterial and fungal abundance levels. In fact, the environments harboring such high fungal abundance and a high fungal to bacterial ratio are usually rich in carbon, like the litter horizon in forest soils (Baldrian et al. 2012). The Chao1 index evidenced higher bacterial than fungal species richness in our NM soil samples, as previously shown in other soils (Gottel et al.

2011). Freshly contaminated soils usually harbor low bacterial richness, evenness and diversity after spiking (Ding et al. 2012). Yet bacterial richness and diversity in our NM soil was relatively high and comparable to the levels found in a diesel-contaminated soil in Poland (Sutton et al. 2013) and in an aged PAH-contaminated soil from a coking plant wasteland in Beijing, China (Xu et al. 2014), using a similar sequencing effort. The result from our NM soil suggests a long-term adaptation of the microbial community toward a diversified and pollutant-resistant community. In addition, fungal richness was close to the richness found in forest soils (Coince et al. 2013), but fungal diversity was relatively low and close to the level found in a soil highly contaminated by hydrocarbons (Bell et al. 2014).

The dominance of 3 bacterial phyla (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Bacteroidetes*) and *Ascomycota* and unclassified fungi with poor representation of *Basidiomycota* is in accordance with fingerprinting analyses of dominant bacterial and fungal species inhabiting the NM soil (Cébron et al. 2009; Thion et al. 2012). Overall, at the phylum level, the bacterial and fungal community diversities were close to other soil types. However the relative proportion of each bacterial phylum seems to be specific to polluted environments, contrary to fungal ones. *Proteobacteria* are usually the dominant phylum in contaminated soils (Gołębiewski et al. 2014). The co-occurrence of *Alpha-*, *Beta-* and *Gamma-Proteobacteria* in similar relative proportions (15 - 21%) seems typical of polluted soils: *Alpha-* are usually in higher proportions in non-contaminated soils, while *Beta-* and *Gamma-* subdivisions are favored in hydrocarbon-contaminated soils (Labbé et al. 2007). Furthermore, *Actinobacteria* was the second most abundant phylum in our NM soil as found in other heavy-metal contaminated soils (Gremion et al. 2003; Gołębiewski et al. 2014). *Actinobacteria* were previously described in extremely arid environments (Köberl et al. 2011b), with similar properties (low nutrient and low carbon availability) to aged multi-contaminated soil. Finally, some genera belonging to the *Actinobacteria* are able to degrade PAH compounds (Kallimanis et al. 2007). Members of *Acidobacteria* were found scarce in our NM soil as found in other PAH-contaminated soil (Xu et al. 2014), but they were largely less represented than in non-polluted soils (Roesch et al. 2007; Nacke et al. 2011). Overall, similar fungal phylum diversity was also found in non-polluted soils (Buée et al. 2009b).

6.5.2 Impact of edaphic parameters on soil microbial diversity over time

Although this result could be specific to this particular site under specific climatic condition, the NM soil monitoring over 6 years revealed interesting relationship between bacterial and

fungus diversity and edaphic parameters. Our canonical correspondence analysis showed that a temporal shift occurred in the composition of the soil microbial community, with some taxa correlated with modifications in edaphic parameters.

Among the different soil parameters that increased simultaneously over time (C/N ratio, available phosphorous, extractable iron, copper, chrome, zinc concentrations), the pH can be an important driver of the bacterial community but not of the fungal one (Rousk et al. 2010). Most orders belonging to *Acidobacteria* were favored over time, with subgroup-16 positively correlated with pH values. Unlike the other subgroups the relative abundance of *Acidobacteria* subgroup 1 was greater at T0 and was negatively correlated with the pH level, as previously found (Rousk et al. 2010).

Despite a low availability and mobility of PAH and HM, and significant decrease of these fractions over time (Ouvrard et al. 2011), we observed a significant decrease in total PAH (c.a. 40% dissipation) and extractable Zn concentrations over the 6 years of monitoring that could also contribute to explain changes in microbial diversity. Xu et al. (2014) suggested that a decrease in pollutant concentration allowed for the development of members of the *Acidobacteria* phylum in a PAH-contaminated soil. The PAH decrease could also explain the emergence of PAH-degrading microorganisms that benefited from the biodegradation of the pollutant. As previously observed (Cébron et al. 2009; Thion et al. 2012), OTUs affiliated to the *Arthrobacter* and *Fusarium* genera increased over time in NM soil samples. Members of the *Arthrobacter* and *Fusarium* genera have been found in hydrocarbon-contaminated environments (Panov et al. 2013; Lladó et al. 2013) and could be potential PAH degraders (Kallimanis et al. 2007; Hong et al. 2010). The relative abundance of the *Nitrospirae* phylum, one *Nitrospira* OTU and the *Nitrospirales* order increased over time. On CCA it was positively correlated to the C/N ratio, and negatively correlated to total nitrogen content. This bacterial group is more competitive with other nitrite-oxidizing bacteria (i.e. *Nitrobacter*) in soils with low N availability (Attard et al. 2010). Relative abundance of the *Gemmatimonadetes* phylum and one OTU affiliated to the *Gemmatimonas* genus also increased over time. Although members of this phylum are frequently detected in soils and more prevalent in dry soils with poor nutrient availability and low microbial activity (DeBruyn et al. 2011), their ecological properties are still unclear.

On the contrary, the relative abundance of other microbial taxa decreased over time. The

fungal *Eurotiales* order and one OTU affiliated to *Talaromyces* (*Ascomycota*; *Eurotiales*) were more abundant at T0. This fungal taxon seems to be well adapted to high PAH contamination levels, as similar strains were isolated from an oil-contaminated soil and were able to grow at high PAH concentrations (Reyes-César et al. 2014). Within the bacterial community, the relative abundance of the *Gamma-Proteobacteria* phylum and of seven OTUs affiliated to *Gamma-Proteobacteria* decreased over time. Among these, *Thiohalophilus*, *Halothiobacillus*, *Methylohalomonas*, known as halophilic bacteria, could be repressed by the leaching of extractable metals and sulfate salts over time. The relative abundance of *Thiobacillus* (*Beta-proteobacteria*; *Hydrogenophilales*) was the most abundant bacterial OTU at T0 (c.a. 15%), but also decreased over time. *Thiobacillus* was previously detected in heavy metal-contaminated soils (Gołębiewski et al. 2014). The implication of the *Thiobacillus* genus in PAH degradation has also been described (Singleton et al. 2013) although our results indicate a drastic decrease over time.

6.5.3 Impact of vegetation on soil microbial abundance and diversity

Our results show that the plant cover influenced microbial abundance in the NM soil, especially at T4 when the plant cover was the thickest. Although the role of root exudates in regulating soil fungal community composition and diversity is well known (Berg and Smalla 2009), the impact of the rhizosphere on increasing soil fungal abundance, as found here, is less documented as compared to bacteria (Berg and Smalla 2009).

The plant cover had an unexpected impact on fungal and bacterial community structure in the NM soil. At T4, PAH dissipation was significantly lower in presence of plants than in bare soil, probably explained by the release of more easily degradable carbon compounds in root exudates (Tian et al. 2003). At T4, the community diversity is contrasted between bare and alfalfa planted soils, and the multivariate analysis showed that plant biomass is the dominant explicative factor compared to PAH content. Bacterial and fungal diversity indices increased with the presence of vegetation, as previously shown (Cébron et al. 2009; Thion et al. 2012). Although the impact of plants varies depending on seasons, usually fungal and bacterial diversity usually decrease in the rhizospheric or planted soils as compared to the bulk or unplanted controls (Shahsavari et al. 2013; Li et al. 2014). Lower microbial diversity in the rhizosphere could be due to selective pressure from root exudates. In aged hydrocarbon- and heavy metal-contaminated soils that are extremely oligotrophic environments, microbial activity is limited by nutrient availability (Breedveld and Karlson 2000). Most studies describe the impact of plants on microbial diversity in non-contaminated and/or nutrient-rich

soils (e.g. agricultural or forest soils). The presence of plants on a nutrient-poor soil could increase diversity due to the input of diversified carbon and nutrient sources, such as carbohydrates from exudates and plant debris preferentially degraded by bacteria and fungi, respectively. Moreover, the development of plants and roots creates numerous novel niches favoring the establishment of more diverse microbial communities. As previously shown, the functional community was also impacted by plant covers because enzymatic activity measured (FDase, arylamidase, aryl sulfatase, cellulose, urease...) were higher in vegetalized NM soil than in bare soil (Cébron et al. 2011a).

Our analyses allowed us to discriminate between planted soil and bare soil plots and to identify microbial taxa whose relative abundance levels were differently impacted by the presence of plants. *Actinomycetales* and *Arthrobacter*, the most represented order and most abundant OTU of the bacterial community, were positively correlated to alfalfa biomass. Increased numbers of *Actinobacteria* in the rhizosphere of different plant species such as maize (Li et al. 2014) and strawberry (Smalla et al. 2001) are documented. In addition, the *Bradyrhizobiaceae* family and the *Rhizobiales* order were among the dominant bacterial OTUs favored by the development of alfalfa. These nitrogen-fixing bacteria are known to be abundant in the rhizosphere of legumes due to their symbiotic association (McCaig et al. 1999). However we never observed nodules throughout the monitoring period. Finally, the relative abundance of the *Nitrospirae* phylum and *Nitrospira* OTUs, a well-known nitrite-oxidizing group (Koops et al. 2006), decreased in alfalfa-planted plots. Competition for nitrogen between plants and nitrifying bacteria has already been reported in unfertilized nutrient-poor soil (Stienstra et al. 1994).

Plants have a higher impact on fungal than on bacterial community structure. According to our multivariate analysis, most fungal orders were positively correlated to the presence of plants (alfalfa biomass). The relative abundance of *Ascomycota* belonging to the *Pezizomycotina* sub-division and affiliated to various classes, i.e. *Sordariomycetes*, *Leotiomycetes*, *Dothideomycetes*, and *Eurotiomycetes*, increased. Among the *Sordariomycetes*, the *Chaetosphaeriales* and the unclassified *Hypocreales* were the most important orders allowing for discrimination between treatments. Among these orders, the relative abundance of some dominant fungal OTUs affiliated to the *Acremonium*, *Bionectria*, and *Fusarium* genera significantly increased with the presence of alfalfa. While the *Acremonium* genus is well-known as a fungal endophyte of plants that improves mineral

nutrition (Rahman and Saiga 2007), *Bionectria* and *Fusarium* species are often plant pathogens (Luo and Zhuang 2010; Pegg and Parry 1983). Conversely, in bare soil the *Microascales* order was the only one whose relative abundance increased. Although alfalfa was co-inoculated with two mycorrhizal *Glomus* strains, *Glomeromycota* was not a dominant phylum, but its relative abundance was higher in planted plots. Our results show that unclassified *Glomeromycota* were more correlated with planted soil after 6 years than after 2 years. Colonization of roots by mycorrhizal fungi was detected only after 6 years, suggesting potential initial toxicity of the contaminated soil towards mycorrhizal fungi, as suggested previously in Ouvrard et al. (2011).

6.6 Conclusion

To conclude, the high fungal and bacterial abundance levels in the NM soil probably reflect its high carbon content due to contamination. Microbial diversity and richness in the aged-contaminated soil were surprisingly high and closer to that found in an unstressed soil than in freshly contaminated soil. A specific microbial community settled over time through modifications of edaphic parameters, pollution content and due to the presence of plants. Over time the C/N increased, due to a decrease of soil nitrogen content (no fertilization), favoring *Nitrospirae* phylum, and nitrogen-fixing bacteria in planted soil. Over time the pH increased, probably due to sulphate leaching that favoured some *Acidobacteria* groups and repressed halophilic bacteria. In 6 years the decrease of PAH content by *c.a.* 40% favoured the appearance of few taxa previously described as PAH degraders. The modification of pollution content and bioavailability contributed probably to reduce environment toxicity and led to adaptation in microbial community composition. The alfalfa cover structured the microbial community, probably due to a rhizosphere effect while this partly inhibited the PAH dissipation. Indeed vegetation (i) selected a specific community by releasing root exudates or plant debris that input nutrient sources more easily degraded than PAHs in the oligotrophic soil; (ii) increased bacterial diversity and (iii) favoured most fungal species compared to bare soil.

6.7 Acknowledgements

This study was funded by OTELo (Observatoire Terre et Environnement de Lorraine) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-2008-CESA-010 and ANR-13-JSV7-0007_01). The authors thank the GISFI (www.gisfi.fr) for the access to the experimental site at Homécourt and Annie Buchwalter for English editing.

Chapitre 7 : **Discussion générale**

7. Discussion générale

7.1 *Prise en compte de la variabilité spatiale : quelles échelles, quels dispositifs, quels résultats ?*

L'hétérogénéité d'une pollution est couramment étudiée à grande échelle afin de caractériser la contamination d'un site. En revanche, les processus rhizosphériques et microbiens se produisent à des échelles plus petites, de micrométriques à centimétriques. Par ailleurs, bien que les mesures *in situ* soient indispensables pour observer un phénomène dans ces conditions réelles, il est parfois nécessaire de se placer en conditions plus simplifiées pour limiter les interactions croisées entre différents phénomènes et ainsi permettre de mieux observer les liens entre les processus. Dans le cadre de notre étude, des approches à différentes échelles, métriques et centimétriques, ont été réalisées ainsi que des mesures *in situ* et des expériences simplifiées en laboratoire. Dans les mesures *in situ*, bien que les prélèvements réalisés à l'échelle métrique d'une parcelle permettaient d'avoir une approche réelle des mécanismes, ils ne permettaient cependant pas de prendre en compte la variabilité spatiale des phénomènes. En effet, 6 prélèvements aléatoires par parcelle, ne distinguant pas le sol rhizosphérique du sol total, ont été homogénéisés afin de constituer un échantillon unique. De tels dispositifs peuvent cependant présenter un intérêt pour étudier la variabilité spatiale d'un phénomène à grande échelle, notamment dans le cadre d'études biogéographiques, lorsque l'échantillonnage est réalisé de manière spatialisée. En revanche, dans la partie expérimentation en microcosme au laboratoire, les dispositifs ont été conçus pour permettre un échantillonnage spatialisé et non destructif à l'échelle centimétrique pour appréhender l'impact de la variabilité spatiale dans la rhizosphère.

Beaucoup d'études de rhizoremédiation sont habituellement menées à partir d'expériences en pots, cependant ce type de dispositif n'est pas adapté à un prélèvement spatialisé des échantillons avec précision, c'est pourquoi notre choix s'est porté sur un rhizotron. En plus de pouvoir visualiser l'hétérogénéité du système racinaire dans sa globalité, ces rhizotrons ont été conçus de manière à pouvoir être ouverts sur la face avant, donnant ainsi accès aux racines, et permettant la réalisation de différents prélèvements dans l'espace. La durée de l'expérimentation a été fixée suite à des essais préliminaires qui nous ont permis d'estimer le temps nécessaire à une colonisation suffisante du dispositif (une trentaine de jours) pour obtenir un gradient visuel de densité racinaire, reflétant un gradient rhizosphérique à l'échelle centimétrique. La courte durée de l'expérimentation, imposée par la croissance rapide des plantes, nous a amené à faire des choix sur la contamination du sol que nous souhaitons

étudier. La sélection d'un sol de friche industrielle contaminé était évidente, pour refléter une situation réelle de contamination et non pas l'ajout artificiel d'un contaminant dans un sol sain, et pour étudier les communautés microbiennes adaptées à une pollution complexe. Toutefois, la faible disponibilité des polluants dans ce type de sols industriels historiquement contaminés limitait la possibilité de pouvoir observer l'impact des plantes sur la dégradation des HAP sur la période d'une expérimentation en rhizotron, c'est pourquoi nous avons choisi de recontaminer le sol de friche utilisé. Afin de conserver des conditions au plus proches de celles rencontrées dans l'environnement, nous avons effectué une recontamination à partir d'un extrait organique complexe issu du même sol. Bien que cette manipulation soit fastidieuse du fait de la grande quantité de chloroforme nécessaire, on peut considérer qu'il s'agit d'un bon « compromis » entre une augmentation de la biodisponibilité et une conservation de la complexité de la contamination, couramment rencontrée dans l'environnement.

Au cours de l'étude de la variabilité spatiale des processus, nous avons pu mettre en évidence, grâce à l'utilisation des géostatistiques, l'existence d'un gradient physique (biomasse racinaire) et chimique (sucre, pH) avec la profondeur dans les rhizotrons (**Figure 6.1**). Ce gradient rhizosphérique structurait la variabilité spatiale des communautés microbiennes, en termes de diversité, de richesse et d'abondance. Ces résultats sont cohérents avec la littérature où il a été largement décrit que la rhizosphère impactait les communautés microbiennes du sol, même contaminé. Toutefois l'établissement d'un gradient spatial à l'échelle centimétrique qui prend en compte l'intégralité du système racinaire n'avait à notre connaissance pas encore été modélisé avec cet outil géostatistique qui permet de le cartographier.

Dans le dispositif étudié, l'hypothèse testée était que le gradient rhizosphérique qui structure les communautés microbiennes, pouvait impacter l'efficacité de la biodégradation et donc la teneur en HAP. Cependant, le gradient rhizosphérique ne semble pas induire de structuration spatiale du polluant à notre échelle d'étude (**Figure 6.1**), ce qui peut suggérer l'existence d'un gradient à une échelle plus fine que le centimètre. En effet, bien que le sol initialement tamisé à 2 mm soit considéré comme homogène à l'échelle centimétrique, la recontamination artificielle et le développement racinaire ont pu induire une hétérogénéité à une échelle plus fine, de l'ordre de l'agrégat (millimétrique), ce qui pourrait avoir un impact lors du sous-échantillonnage. Dans notre plan d'expérimentation, il nous paraissait essentiel de pouvoir caractériser chacun des échantillons prélevés au sein du système racinaire d'un point de vue

Pour remédier à ce problème d'échelle on pourrait envisager l'utilisation de méthodes non destructives, avant échantillonnage, permettant de cartographier à l'échelle du système racinaire intègre, des paramètres reflétant les processus rhizosphériques. Par exemple, des variations d'activité ont pu être observées à travers la rhizosphère grâce à des optodes planes permettant des mesures optiques de la décroissance de la fluorescence de marqueurs d'O₂ et de pH (Rudolph et al. 2012; Blossfeld et al. 2011). Le développement de la zymographie, une technique associée à de l'imagerie qui utilise un gel d'agarose de 0,1 cm d'épaisseur contenant le substrat d'une enzyme pour suivre sa dégradation, a ainsi déjà permis de cartographier des activités enzymatiques, telles que l'amylase et la protéase dans la rhizosphère en utilisant également des rhizotrons (Spohn et al. 2013). Ces différentes approches permettraient d'identifier des zones d'intérêt, pour se placer par la suite à une échelle plus fine dans la rhizosphère. Dans le cas d'une quantité de sol suffisante, une approche multiparamétrique similaire à celle adoptée dans ces travaux pourrait être reconduite. En effet, les géostatistiques pourraient être utilisées de la même manière pour cartographier à une échelle inférieure (mm par exemple) la variabilité spatiale dans la rhizosphère (Nunan et al. 2002). Cependant, à une échelle aussi fine que celle de la racine, il est possible d'envisager que la quantité de sol sera probablement insuffisante pour mener des analyses telles que celles décrites dans ma thèse, c'est pourquoi il faudrait adapter les techniques d'analyse à l'utilisation de quelques mg de sol ou mettre en œuvre des techniques *in situ* non destructives. Ainsi, l'utilisation couplée de méthodes telles que la FISH (Fluorescence in situ Hybridization) (Eickhorst and Tippkötter 2008; Christensen et al. 1999) avec la NanoSIMS (Nanoscale Secondary Ion Mass Spectrometry) (Clode et al. 2009; Eickhorst et al. 2015), ou la microspectroscopie RAMAN (Huang et al. 2007) en utilisant des polluants marqués (¹³C), pourrait permettre de caractériser l'organisation spatiale de la communauté microbienne ayant incorporé le substrat marqué en lien avec la localisation du polluant, dans des échantillons non déstructurés de sol et à l'échelle de la racine. Cette approche est d'ailleurs envisagée au sein de l'ANR RhizOrg, à laquelle mes travaux de thèse sont rattachés.

L'absence de visualisation d'un gradient spatial des HAP peut également être due à une biodisponibilité des polluants trop faible au temps de mesure, car la totalité des HAP ajoutés artificiellement ont été dégradés et ceux restant sont les HAP historiques trop récalcitrants pour pouvoir être dégradés par les communautés microbiennes. En fait, un gradient spatial des HAP s'est probablement établi au cours du développement racinaire, mais a disparu à 37

jours. En effet, même la deuxième expérimentation en rhizotrons, initialement faite pour suivre au cours du temps la cinétique de dégradation, a montré que les HAP biodisponibles, apportés par la recontamination, étaient dégradés très rapidement (au bout de 6 jours) (**Figure 6.1**). C'est pourquoi nous pouvons penser qu'à 37 jours, la carte représentant la teneur en HAP correspond aux HAP historiques. Ces derniers ne présentent pas de structuration spatiale organisée, mais plutôt une répartition de type pépitique comme retrouvée dans l'environnement à plus grande échelle. Pour pallier à ce décalage dans le temps de la biodisponibilité des HAP et du développement racinaire, qui limite l'étude de l'effet des plantes sur la structuration spatiale des HAP, il est possible d'envisager de développer un dispositif permettant d'ajouter une contamination fraîche à une rhizosphère déjà développée, notamment *via* l'insertion à différents endroits de patches de sol recontaminé qui pourraient être prélevés par la suite pour analyse.

Par ailleurs on peut s'interroger sur l'impact de la présence de plante sur l'hétérogénéité des HAP, pour ce faire il faudrait comparer la variabilité spatiale au sein de rhizotrons plantés et sans plante. Au cours de l'expérimentation en rhizotrons N°2, des dispositifs non plantés ont été mis en place afin de comparer la cinétique de dégradation des HAP en présence et en absence de plante. Bien que les résultats présentés dans le chapitre 5 ne concernent qu'une seule hauteur, des prélèvements réalisés en réalité à 3 profondeurs différentes (3 cm, 9 cm et 15 cm) ont été analysés après 22 jours (T4) (**Annexe 5.5**). Globalement aucune structuration spatiale des HAP n'a été observée (**Annexe 5.3**), malgré la présence d'un gradient rhizosphérique (**Annexe 5.2**) et microbien (**Annexe 5.4**), dans les rhizotrons (**Figure 6.1**). Ces résultats soulèvent à nouveau les problèmes de décalage dans le temps entre la biodisponibilité des HAP et le développement racinaire.

7.2 Impact de l'espèce végétale sur les HAP et les communautés microbiennes dégradantes : un effet spatial ?

Au cours de la première expérimentation en rhizotrons, nous avons comparé deux plantes présentant des systèmes racinaires contrastés, le ray-grass et la luzerne. Nous avons pu observer que chaque espèce végétale avait une morphologie racinaire qui lui était spécifique, ce qui s'est traduit par des gradients différents dans les rhizotrons, concernant les teneurs en sucres, le pH, la densité et la diversité des communautés microbiennes (**Figure 6.1**). Le système racinaire de la luzerne, plus hétérogène que celui du ray-grass, est le seul à structurer spatialement la diversité taxonomique des communautés bactériennes, à l'échelle

centimétrique (**Figure 6.1**). L'analyse de la diversité a été réalisée dans un premier temps sur un maillage plus grossier (6 cm entre les échantillons), ce qui était insuffisant pour modéliser la structuration spatiale de la communauté bactérienne. Cependant, on ne peut pas exclure qu'à une échelle plus fine le système racinaire du ray-grass pourrait aussi induire un gradient de diversité avec la profondeur ou avec la distance aux racines. Il serait donc intéressant d'analyser la diversité taxonomique des 16 échantillons restants par dispositif pour cartographier la répartition spatiale des phyla bactériens, à l'échelle du système racinaire global de chaque plante. Les différentes études, menées à court et long terme, ont mis en évidence dans les sols contaminés une capacité des communautés microbiennes à s'adapter à la présence de plantes en plus de la pollution, en favorisant une communauté spécifique. D'autres analyses de diversités par séquençage haut-débit, menées à partir des extraits d'ARN échantillonnés au cours de l'expérimentation en rhizotron N°2, permettront de préciser l'effet rhizosphère sur l'activité bactérienne dans ces environnements contaminés.

Une différence significative de dégradation des HAP a été observée entre les deux plantes, en prenant en compte la totalité des données sans leurs coordonnées spatiales (**Figure 6.1**). Cependant la dégradation étant réalisée en 1 semaine, la mise en place de nouveaux essais sur des pas de temps plus courts, de l'ordre du jour, seraient nécessaires pour préciser ce résultat. Cette différence pourrait être due à la qualité des exsudats racinaires qui favorisent des communautés microbiennes différentes. Toutefois, dans cette étude seuls les sucres et le carbone organique dissous ont pu être quantifiés. L'analyse d'autres composés, notamment les acides organiques qui représentent une grande proportion des exsudats, permettrait de caractériser davantage l'impact de l'espèce végétale. Par ailleurs, on pourrait également s'intéresser à la diversité de la communauté fongique qui, dans ces expériences en microcosmes, n'a pas été étudiée. En termes d'abondance des gènes codant les HAP-dioxygénases, les deux espèces végétales ne présentaient pas de différences significatives (**Figure 6.1**), cependant qu'en est-il de l'activité réelle de la population capable de dégrader les HAP ? Il pourrait être intéressant d'étudier ce paramètre afin de déterminer si une des deux espèces végétales favorise davantage l'une des deux populations possédant des HAP-dioxygénase, ce qui pourrait expliquer les différences de dégradation observées. D'autre part de nouveaux essais pourraient être mis en place afin de comparer la cinétique de dégradation des HAP et des populations microbiennes entre les deux espèces végétales.

7.3 Variabilité temporelle de la dissipation des HAP et des communautés fonctionnelles dans la rhizosphère

Au cours de ma thèse, l'aspect temporel des processus dans la rhizosphère d'un même sol contaminé a été étudié selon 3 échelles de temps différentes, allant de l'année, au mois et à la semaine (**Figure 6.1**). Lors de l'étude *in situ* de l'impact d'un couvert végétal sur ce sol, nous avons observé qu'à long terme (6 ans) les communautés bactériennes et fongiques se sont adaptées à la pollution et semblent suivre une forme de résilience. En fait, ce phénomène dépend à nouveau essentiellement de la biodisponibilité des HAP. Contrairement à une contamination fraîche, qui représente un stress et qui sélectionne une communauté capable de survivre ou de dégrader la pollution, ici sur le plus long terme la contamination étant très faiblement biodisponible, une communauté microbienne présentant une structure taxonomique proche d'un sol non pollué est retrouvée. Toutefois, ce sol conserve une communauté fonctionnelle spécifique, notamment capable de dégrader les HAP, favorisée par la présence de pollution (Cébron et al. 2009). Sur les parcelles, le paramètre qui influence le plus la communauté microbienne est la présence de plante celle-ci augmente la diversité bactérienne et fongique. Par contre, l'atténuation naturelle des HAP, qui atteint près de 40% en 6 ans, est ralentie en présence de luzerne. Ces résultats suggèrent que sur une longue période, l'effet rhizosphère reste mesurable mais la très faible part des HAP disponibles et la cinétique très lente des processus ne permettent pas d'observer l'action des plantes sur l'activité des populations microbiennes impliquées dans la dégradation des HAP. Par ailleurs, lorsque la biodisponibilité des HAP est très faible, les microorganismes auraient tendance à davantage dégrader les sources de carbones exsudées par les plantes que les HAP adsorbés à la matrice du sol.

Cette hypothèse a été confirmée par les deux expérimentations menées au laboratoire. Au cours de la première étude en rhizotron, après 1 mois d'incubation, la totalité de la fraction biodisponible des HAP a été dégradée, en parallèle d'une augmentation de la densité des populations bactériennes dégradantes, et des teneurs en carbone organique dissous et des sucres, suggérant un impact positif des plantes sur la dégradation des polluants (**Figure 6.1**). Toutefois cet effet ne pouvait être attribué au seul fait des plantes car les mesures n'avaient pas été réalisées sur un rhizotron sans plante au même temps. En prenant en compte l'existence de ces biais et la rapidité des processus, une deuxième expérimentation en rhizotron a été mise en place. Afin de préciser la variabilité temporelle des HAP dans la rhizosphère, une culture de plantes sur une période d'un mois, avec des prélèvements chaque

semaine sur des rhizotrons non-plantés et plantés a été réalisée. Le dispositif a été conçu en deux compartiments, avec un système de préculture de la plante afin d'obtenir dès le premier prélèvement (6 jours) une colonisation racinaire du sol recontaminé. Cependant, les résultats ont montré qu'en 6 jours la totalité de la fraction biodisponible des HAP avait déjà été dégradée en parallèle d'une augmentation du nombre de gènes de HAP dioxygénases et de leur transcrits, en présence ou non de plantes (**Figure 6.1**). Un effet significatif des plantes n'a été détecté qu'après 12 jours (lorsque qu'il ne restait plus que la contamination historique) se traduisant par une activité dioxygénase plus importante en présence de plantes. Cependant cet effet positif, probablement associé à « un priming effect », semble transitoire puisqu'à la fin de la cinétique l'activité dioxygénase semble réprimée, soit par la disparition de la fraction disponible des HAP, ou peut-être par la libération des exsudats racinaires, suggérant une compétition entre des sources de carbones labiles (exsudats) et plus complexes (HAP) pour la dégradation microbienne.

Afin de confirmer cette hypothèse il serait intéressant de caractériser davantage l'évolution des exsudats racinaires au cours du temps, ce qui pourrait permettre d'identifier les composés (sucres, acides organiques, acides aminés) qui influencent l'activité dioxygénase. Au sein des communautés actives, il serait intéressant de caractériser l'évolution de la diversité taxonomique, pour mieux comprendre la variabilité temporelle des communautés bactériennes en lien avec la dynamique de la rhizosphère. On pourrait également caractériser l'évolution de l'activité des communautés microbiennes, notamment par des mesures d'activités enzymatiques reliées à des grandes fonctions, ou à des capacités de dégradation (Biolog®) (Burns et al. 2013; Caldwell 2005). De plus, l'utilisation de molécules marquées au ^{13}C permettrait d'identifier les communautés qui métabolisent les HAP et leur métagénome, en combinant la technique du DNA-Stable Isotope Probing (SIP) au séquençage haut-débit (Uhlik et al. 2013; Singleton et al. 2013; Vila et al. 2015). Cependant, cette approche impliquerait d'étudier la dégradation d'une seule molécule de polluant. L'utilisation d'une contamination complexe dans ce type d'expérimentation conduirait alors à des cinétiques de dégradation variées selon la molécule, ce qui peut rendre difficile l'interprétation des résultats et la compréhension des mécanismes. Au cours de nos expérimentations en rhizotrons, le choix d'une contamination complexe a été fait pour refléter les conditions *in situ*. Nous avons considéré que cette re-contamination avec un extrait organique complexe conduirait à une biodégradation des HAP plus lente, par rapport à une contamination par un seul composé (phénanthrène) dont la dégradation s'était avérée trop rapide (6 jours) pour observer l'effet

des plantes (Cébron et al. 2011b). Cependant, les résultats obtenus lors de l'expérimentation en rhizotron N^o2 suggèrent de s'intéresser à des cinétiques encore plus courtes que celles étudiées ou de complexifier davantage la contamination, par exemple en utilisant un goudron de houille qui pourrait être entièrement marqué au ¹³C. Les variabilités spatiales et temporelles des processus rhizosphériques, de la teneur en HAP et des communautés microbiennes devaient être prises en compte simultanément dans la deuxième expérience en rhizotrons (*Chapitre 5*) puisque 3 profondeurs et quatre temps de prélèvements ont été réalisés. Toutefois, les cinétiques rapides de colonisation racinaire et de dissipation des HAP artificiellement ajoutés n'ont pas permis d'exploiter ces deux paramètres. Ces travaux mériteraient d'être poursuivis pour préciser la dynamique spatio-temporelle des processus étudiés, sur des échelles de temps et d'espace plus courtes.

Globalement, dans des sols pollués présentant une contamination complexe, la biodisponibilité des HAP est un élément essentiel, variable dans le temps et l'espace qui conditionne la dégradation des HAP et donc leurs hétérogénéités dans le sol. La distribution des HAP n'est pas structurée à l'échelle centimétrique lorsque l'on considère une période de 1 mois de développement végétal, laps de temps trop important pour suivre la cinétique de biodégradation des HAP biodisponibles. Cela souligne la difficulté de trouver une échelle de temps adaptée à l'étude simultanée de ces deux paramètres. L'ajout de plantes dans ces systèmes induit une variabilité spatiale et temporelle, dépendante de l'espèce végétale, selon un gradient de profondeur qui structure la densité et la diversité des populations microbiennes dans le sol. Le séquençage haut-débit est un outil puissant, qui nous a permis d'acquérir un grand nombre de données, et de mesurer l'impact de la pollution, de la présence de plantes et de l'espèce végétale sur la diversité taxonomique. Bien qu'intéressant, ces résultats ne permettent pas de conclure quant à l'impact de ces différents facteurs sur le fonctionnement du sol, du fait d'une caractérisation fonctionnelle encore limitée des différents taxons microbiens. L'étude de l'effet des plantes sur les HAP et les communautés microbiennes reste complexe car ces phénomènes suivent des variabilités temporelles différentes, et parfois selon des échelles de temps différentes.

Conclusion générale

Au cours de cette thèse, l'utilisation d'une approche pluridisciplinaire et multi-échelle a permis de mettre en évidence l'importance de la variabilité spatio-temporelle de la rhizosphère, des HAP et des communautés microbiennes dans les mécanismes de dissipation du polluant dans un sol historiquement contaminé.

La dynamique des HAP au cours du temps, à travers l'évolution de leur biodisponibilité, est un paramètre essentiel qui régit l'adaptation des communautés microbiennes à la pollution en modifiant l'abondance et l'activité des populations dégradantes. L'impact des végétaux sur la biodégradation des HAP est variable selon l'échelle de temps étudiée. En effet *in situ* et à long terme (année), lorsque la fraction disponible en polluant est faible, les plantes semblent ralentir la dégradation des HAP, tandis que lors d'expérimentation en microcosmes (semaine), les exsudats favorisent l'activité de la dégradation microbienne. Ces résultats illustrent l'intérêt d'utiliser une approche combinant des expérimentations simplifiées au laboratoire et plus complexes sur le terrain, permettant une meilleure compréhension des processus.

Au niveau spatial, un gradient rhizosphérique avec la profondeur, dépendant de l'espèce végétale, structure l'abondance, la diversité et la richesse des communautés microbiennes, sans avoir d'effet sur les concentrations en HAP, suggérant un « décalage » dans les échelles de temps et d'espace des différents paramètres étudiés. Cette superposition d'échelles et l'hétérogénéité initiale de la pollution tendent à complexifier la compréhension des mécanismes étudiés. Considérant ces différents points, pour aller plus loin dans la compréhension des processus qui contrôlent le devenir de ces polluants dans la rhizosphère, il faudrait s'affranchir de ces contraintes, par exemple *via* des approches non-destructives permettant une analyse plus ciblée des mécanismes rhizosphériques. Par ailleurs, dans la rhizosphère, les dynamiques spatiales et temporelles sont dépendantes l'une de l'autre car liées à la croissance végétale, c'est pourquoi il serait pertinent d'appréhender la question spatio-temporelle de façon combinée à la fois sur la structure, l'abondance et l'activité microbienne, sur la caractérisation du sol rhizosphérique et des exsudats et sur les processus de biodégradation des HAP, en considérant les différents pools de HAP, qu'ils soient biodisponibles ou récalcitrants.

Références

Références

-A-

- Abed RM, Al-Kindi S, Al-Kharusi S (2015) Diversity of bacterial communities along a petroleum contamination gradient in desert soils. *Microb Ecol* 69:95–105.
- Ahn S, Werner D, Luthy RG (2005) Physicochemical characterization of coke- plant soil for the assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon availability and the feasibility of phytoremediation. *Environ Toxicol Chem* 24:2185–2195.
- Akhmetov LI, Filonov AE, Puntus IF, et al (2008) Horizontal transfer of catabolic plasmids in the process of naphthalene biodegradation in model soil systems. *Microbiology* 77:23–32. doi: 10.1134/S0026261708010049
- Alagić S, Maluckov B, Radojičić V (2015) How can plants manage polycyclic aromatic hydrocarbons? May these effects represent a useful tool for an effective soil remediation? A review. *Clean Technol Environ Policy* 17:597–614. doi: 10.1007/s10098-014-0840-6
- Aleklett K, Leff JW, Fierer N, Hart M (2015) Wild plant species growing closely connected in a subalpine meadow host distinct root-associated bacterial communities. *PeerJ* 3:e804.
- Alexander M (2000) Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ Sci Technol* 34:4259–4265.
- Allard A-S, Remberger M, Neilson AH (2000) The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote-contaminated soil. *Int Biodeterior Biodegrad* 46:43–49. doi: 10.1016/S0964-8305(00)00050-0
- Altschul SF, Gish W, Miller W, et al (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Ambrosoli R, Petruzzelli L, Minati JL, Marsan FA (2005) Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions. *Chemosphere* 60:1231–1236.
- Amellal N, Portal J-M, Berthelin J (2001a) Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. *Appl Geochem* 16:1611–1619. doi: 10.1016/S0883-2927(01)00034-8
- Amellal N, Portal J-M, Vogel T, Berthelin J (2001b) Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-degrading bacteria within polluted soil aggregates. *Biodegradation* 12:49–57. doi: 10.1023/A:1011909107858
- Anderson TA, Guthrie EA, Walton BT (1993a) Bioremediation. *EST* 27:2631–2636.
- Angove MJ, Fernandes MB, Ikhsan J (2002) The sorption of anthracene onto goethite and kaolinite in the presence of some benzene carboxylic acids. *J Colloid Interface Sci* 247:282–289.

- Appert-Collin J, Dridi-Dhaouadi S, Simonnot M, Sardin M (1999) Nonlinear sorption of naphthalene and phenanthrene during saturated transport in natural porous media. *Phys Chem Earth Part B Hydrol Oceans Atmosphere* 24:543–548.
- Aprill W, Sims RC (1990) Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20:253–265. doi: 10.1016/0045-6535(90)90100-8
- Attard E, Poly F, Commeaux C, et al (2010) Shifts between Nitrospira- and Nitrobacter- like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices. *Environ Microbiol* 12:315–326.
- Azarbad H, Niklińska M, Laskowski R, et al (2015) Microbial community composition and functions are resilient to metal pollution along two forest soil gradients. *FEMS Microbiol Ecol* 91:1–11.

-B-

- Badri DV, Vivanco JM (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ* 32:666–681.
- Baldrian P, Kolarik M, Stursova M, et al (2012) Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *ISME J* 6:248–258.
- Barnier C (2009) Disponibilité des HAP dans les sols de friches industrielles et influence des conditions rhizosphériques.
- Baudoin E, Benizri E, Guckert A (2002) Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Appl Soil Ecol* 19:135–145. doi: 10.1016/S0929-1393(01)00185-8
- Baudoin E, Benizri E, Guckert A (2001) Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments. *Eur J Soil Biol* 37:85–93. doi: 10.1016/S1164-5563(01)01071-8
- Becker JM, Parkin T, Nakatsu CH, et al (2006) Bacterial activity, community structure, and centimeter-scale spatial heterogeneity in contaminated soil. *Microb Ecol* 51:220–231.
- Becklin KM, Hertweck KL, Jumpponen A (2012) Host identity impacts rhizosphere fungal communities associated with three alpine plant species. *Microb Ecol* 63:682–693.
- Bell TH, El-Din Hassan S, Lauron-Moreau A, et al (2014a) Linkage between bacterial and fungal rhizosphere communities in hydrocarbon-contaminated soils is related to plant phylogeny. *ISME J* 8:331–343.
- Bell TH, Joly S, Pitre FE, Yergeau E (2014b) Increasing phytoremediation efficiency and reliability using novel omics approaches. *Trends Biotechnol* 32:271–280. doi: 10.1016/j.tibtech.2014.02.008
- Bengtsson G, Törneman N (2009) A spatial approach to environmental risk assessment of PAH contamination. *Risk Anal* 29:48–61.

- Bengtsson G, Törneman N, Liphthay J, Sørensen S (2013) Microbial Diversity and PAH Catabolic Genes Tracking Spatial Heterogeneity of PAH Concentrations. *Microb Ecol* 65:91–100. doi: 10.1007/s00248-012-0112-0
- Bengtsson G, Törneman N, Yang X (2010) Spatial uncoupling of biodegradation, soil respiration, and PAH concentration in a creosote contaminated soil. *Environ Pollut* 158:2865–2871.
- Benhabib K, Faure P, Sardin M, Simonnot M-O (2010) Characteristics of a solid coal tar sampled from a contaminated soil and of the organics transferred into water. *Fuel* 89:352–359.
- Berendse F (1990) Organic matter accumulation and nitrogen mineralization during secondary succession in heathland ecosystems. *J Ecol* 413–427.
- Berg G, Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 68:1–13. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x
- Bertrand JC, Caumette P, Lebaron P, Matheron R, Normand P (2012) *Ecologie Microbienne: Microbiologie des milieux naturels et anthropisés*. Presses universitaires de Pau et des Pays de l'Adour.
- Biache C (2010) Evaluation des composants organiques d'un sol de cokerie en contexte d'atténuation naturelle.
- Biache C, Ghislain T, Faure P, Mansuy-Huault L (2011) Low temperature oxidation of a coking plant soil organic matter and its major constituents: An experimental approach to simulate a long term evolution. *J Hazard Mater* 188:221–230. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.01.102
- Biache C, Mansuy-Huault L, Faure P, et al (2008) Effects of thermal desorption on the composition of two coking plant soils: Impact on solvent extractable organic compounds and metal bioavailability. *Environ Pollut* 156:671–677. doi: 10.1016/j.envpol.2008.06.020
- Binet P, Portal JM, Leyval C (2000) Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant Soil* 227:207–213. doi: 10.1023/A:1026587418611
- Binet P, Portal JM, Leyval C (2001) Application of GC–MS to the study of anthracene disappearance in the rhizosphere of ryegrass. *Org Geochem* 32:217–222. doi: 10.1016/S0146-6380(00)00168-6
- Bisht S, Pandey P, Bhargava B, et al (2015) Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. *Braz J Microbiol* 46:7–21.
- Blossfeld S, Gansert D, Thiele B, et al (2011) The dynamics of oxygen concentration, pH value, and organic acids in the rhizosphere of *Juncus* spp. *Soil Biol Biochem* 43:1186–1197.

- Blyth W, Shahsavari E, Morrison PD, Ball AS (2015) Biosurfactant from red ash trees enhances the bioremediation of PAH contaminated soil at a former gasworks site. *J Environ Manage* 162:30–36. doi: 10.1016/j.jenvman.2015.07.041
- Bodelier PL, Wijlhuizen AG, Blom CW, Laanbroek HJ (1997) Effects of photoperiod on growth of and denitrification by *Pseudomonas chlororaphis* in the root zone of *Glyceria maxima*, studied in a gnotobiotic microcosm. *Plant Soil* 190:91–103.
- Bodour AA, Wang J-M, Brusseau ML, Maier RM (2003) Temporal change in culturable phenanthrene degraders in response to long-term exposure to phenanthrene in a soil column system. *Environ Microbiol* 5:888–895. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00481.x
- Bogan BW, Sullivan WR (2003) Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 52:1717–1726. doi: 10.1016/S0045-6535(03)00455-7
- Bonin P, Cravo-Laureau C, Michotey V, Hirschler-Réa A (2004) The anaerobic hydrocarbon biodegrading bacteria: An overview. *Ophelia* 58:243–254. doi: 10.1080/00785236.2004.10410232
- Boonchan S, Britz ML, Stanley GA (2000) Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures. *Appl Environ Microbiol* 66:1007–1019.
- Bordenave S, Goñi-Urriza MS, Caumette P, Duran R (2007) Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 73:6089–6097.
- Bourceret A, Cébron A, Tisserant E, et al (2015) The Bacterial and Fungal Diversity of an Aged PAH- and Heavy Metal-Contaminated Soil is Affected by Plant Cover and Edaphic Parameters. *Microb Ecol* 1–14. doi: 10.1007/s00248-015-0682-8
- Bourceret A, Leyval C, De Fouquet C, Cébron A (in Press) Mapping the centimeter-scale spatial variability of PAHs and microbial populations in the rhizosphere of two plants.
- Bourceret A, Leyval C, Thomas F, Cébron A (Submitted) Plant species with contrasted rhizosphere gradients induce different shift in multi-contaminated soil bacterial diversity.
- Brady NC, Weil RR (2010) Elements of the nature and properties of soils. Pearson Prentice Hall
- Bragg L, Stone G, Imelfort M, et al (2012) Fast, accurate error-correction of amplicon pyrosequences using Acacia. *Nat Meth* 9:425–426. doi: 10.1038/nmeth.1990
- Breedveld GD, Karlsen DA (2000) Estimating the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons for bioremediation of creosote contaminated soils. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:255–261. doi: 10.1007/s002530000362
- Broeckling CD, Broz AK, Bergelson J, et al (2008) Root Exudates Regulate Soil Fungal Community Composition and Diversity. *Appl Environ Microbiol* 74:738–744.

- Buée M, De Boer W, Martin F, et al (2009a) The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil* 321:189–212. doi: 10.1007/s11104-009-9991-3
- Buée M, Reich M, Murat C, et al (2009b) 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol* 184:449–456. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03003.x
- Burns RG, DeForest JL, Marxsen J, et al (2013) Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. *Soil Biol Biochem* 58:216–234.
- Buscot F, Varma A (2005) *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer

-C-

- Caldwell BA (2005) Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. *Pedobiologia* 49:637–644.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303
- Carlson C, Critto A, Marcomini A, Nathanail P (2001) Risk based characterisation of contaminated industrial site using multivariate and geostatistical tools. *Environ Pollut* 111:417–427. doi: 10.1016/S0269-7491(00)00089-0
- Carmichael LM, Pfaender FK (1997) Polynuclear aromatic hydrocarbon metabolism in soils: relationship to soil characteristics and preexposure. *Environ Toxicol Chem* 16:666–675.
- Cavaglieri L, Orlando J, Etcheverry M (2009) Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. *Microbiol Res* 164:391–399. doi: 10.1016/j.micres.2007.03.006
- Cébron A, Beguiristain T, Bongoua-Devisme J, et al (2015) Impact of clay mineral, wood sawdust or root organic matter on the bacterial and fungal community structures in two aged PAH-contaminated soils. *Environ Sci Pollut Res* 1–15.
- Cébron A, Beguiristain T, Faure P, et al (2009) Influence of Vegetation on the In Situ Bacterial Community and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Degradation in Aged PAH-Contaminated or Thermal-Desorption-Treated Soil. *Appl Environ Microbiol* 75:6322–6330.
- Cébron A, Cortet J, Criquet S, et al (2011a) Biological functioning of PAH-polluted and thermal desorption-treated soils assessed by fauna and microbial bioindicators. *Spec Issue Environ Microbiol* 162:896–907. doi: 10.1016/j.resmic.2011.02.011
- Cébron A, Faure P, Lorgeoux C, et al (2013) Experimental increase in availability of a PAH complex organic contamination from an aged contaminated soil: Consequences on biodegradation. *Environ Pollut* 177:98–105. doi: 10.1016/j.envpol.2013.01.043

- Cébron A, Louvel B, Faure P, et al (2011b) Root exudates modify bacterial diversity of phenanthrene degraders in PAH- polluted soil but not phenanthrene degradation rates. *Environ Microbiol* 13:722–736.
- Cébron A, Norini M-P, Beguiristain T, Leyval C (2008) Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J Microbiol Methods* 73:148–159. doi: 10.1016/j.mimet.2008.01.009
- Cerniglia C (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3:351–368. doi: 10.1007/BF00129093
- Cerniglia CE (1997) Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19:324–333.
- Cerniglia CE, Heitkamp MA (1989) Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment. *Metab Polycycl Aromat Hydrocarb Aquat Environ* 41–68.
- Chantigny M, Prévost D, Angers D, et al (1996) Microbial biomass and N transformations in two soils cropped with annual and perennial species. *Biol Fertil Soils* 21:239–244. doi: 10.1007/BF00334898
- Chao A (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat* 265–270.
- Chaudhry Q, Blom-Zandstra M, Gupta SK, Joner E (2005) Utilising the Synergy between Plants and Rhizosphere Microorganisms to Enhance Breakdown of Organic Pollutants in the Environment (15 pp). *Environ Sci Pollut Res* 12:34–48. doi: 10.1065/espr2004.08.213
- Chemidlin Prévost-Bouré N, Christen R, Dequiedt S, et al (2011) Validation and Application of a PCR Primer Set to Quantify Fungal Communities in the Soil Environment by Real-Time Quantitative PCR. *PLoS ONE* 6:e24166. doi: 10.1371/journal.pone.0024166
- Chiapusio G, Pujol S, Toussaint ML, et al (2007) Phenanthrene toxicity and dissipation in rhizosphere of grassland plants (*Lolium perenne* L. and *Trifolium pratense* L.) in three spiked soils. *Plant Soil* 294:103–112. doi: 10.1007/s11104-007-9234-4
- Chiarini L, Bevivino A, Dalmastrì C, et al (1998) Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. *Appl Soil Ecol* 8:11–18. doi: 10.1016/S0929-1393(97)00071-1
- Chilès J-P, Delfiner P (2012) *Geostatistics: Modeling spatial uncertainty*. 2nd edition., 2nd edition. Wiley
- Choudhary VR, Mantri K (2000) Adsorption of Aromatic Hydrocarbons on Highly Siliceous MCM-41. *Langmuir* 16:7031–7037. doi: 10.1021/la991714u

- Christensen H, Hansen M, Sørensen J (1999) Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol* 65:1753–1761.
- Clode PL, Kilburn MR, Jones DL, et al (2009) In situ mapping of nutrient uptake in the rhizosphere using nanoscale secondary ion mass spectrometry. *Plant Physiol* 151:1751–1757.
- Coince A, Caël O, Bach C, et al (2013) Below-ground fine-scale distribution and soil versus fine root detection of fungal and soil oomycete communities in a French beech forest. *Fungal Ecol* 6:223–235. doi: 10.1016/j.funeco.2013.01.002
- Colwell R (2013) EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. 2006.
- Corgié S, Beguiristain T, Leyval C (2004) Spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. *Appl Environ Microbiol* 70:3552–3557.
- Corgié SC, Beguiristain T, Leyval C (2006) Differential composition of bacterial communities as influenced by phenanthrene and dibenzo[a,h]anthracene in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Biodegradation* 17:511–521. doi: 10.1007/s10532-005-9022-x
- Corgié SC, Joner EJ, Leyval C (2003) Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. *Plant Soil* 257:143–150. doi: 10.1023/A:1026278424871
- Cornelissen G, Gustafsson Ö, Bucheli TD, et al (2005) Extensive Sorption of Organic Compounds to Black Carbon, Coal, and Kerogen in Sediments and Soils: Mechanisms and Consequences for Distribution, Bioaccumulation, and Biodegradation. *Environ Sci Technol* 39:6881–6895. doi: 10.1021/es050191b
- Costa R;Götz M;Mrotzek N;Lottmann J;Berg G;Smalla K (2006) Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol Ecol Wiley* 56:236–249.

-D-

- Darrah P (1993) The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant Soil* 155:1–20.
- Davey ML, Heegaard E, Halvorsen R, et al (2012) Seasonal trends in the biomass and structure of bryophyte-associated fungal communities explored by 454 pyrosequencing. *New Phytol* 195:844–856. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04215.x
- Davidova IA, Gieg LM, Duncan KE, Suflita JM (2007) Anaerobic phenanthrene mineralization by a carboxylating sulfate-reducing bacterial enrichment. *ISME J* 1:436–442.

- DeBruyn JM, Nixon LT, Fawaz MN, et al (2011) Global Biogeography and Quantitative Seasonal Dynamics of Gemmatimonadetes in Soil. *Appl Environ Microbiol* 77:6295–6300.
- De Fouquet C (2011) From exploratory data analysis to geostatistical estimation: examples from the analysis of soil pollutants. *Eur J Soil Sci* 62:454–466.
- De Fouquet C, Benoit Y, Carpentier C, et al (2010) On site survey of organic pollutions: some results of the LOQUAS project.
- De Fouquet C, Benoit Y, Carpentier C, Fricaudet B (2011) Uncertainties on the Extension of a Polluted Zone. American Society of Mechanical Engineers, pp 1307–1312
- Demougeot-Renard H, De Fouquet C (2004) Geostatistical approach for assessing soil volumes requiring remediation: Validation using lead-polluted soils underlying a former smelting works. *Environ Sci Technol* 38:5120–5126.
- Demougeot-Renard H, de Fouquet C, Renard P (2004) Forecasting the number of soil samples required to reduce remediation cost uncertainty. *J Environ Qual* 33:1694–1702.
- Deng L, Zeng G, Fan C, et al (2015) Response of rhizosphere microbial community structure and diversity to heavy metal co-pollution in arable soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:8259–8269. doi: 10.1007/s00253-015-6662-6
- Dequiedt S, Saby N, Lelievre M, et al (2011) Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Glob Ecol Biogeogr* 20:641–652.
- Dequiedt S, Thioulouse J, Jolivet C, et al (2009) Biogeographical patterns of soil bacterial communities. *Environ Microbiol Rep* 1:251–255.
- Ding GC;Heuer H;Smalla K (2012) Dynamics of bacterial communities in two unpolluted soils after spiking with phenanthrene: soil type specific and common responders. *Front Microbiol* 3:290.
- Ding G-C, Heuer H, Zühlke S, et al (2010) Soil Type-Dependent Responses to Phenanthrene as Revealed by Determining the Diversity and Abundance of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Ring-Hydroxylating Dioxygenase Genes by Using a Novel PCR Detection System. *Appl Environ Microbiol* 76:4765–4771. doi: 10.1128/AEM.00047-10
- D’Orazio V, Ghanem A, Senesi N (2013) Phytoremediation of pyrene contaminated soils by different plant species. *CLEAN–Soil Air Water* 41:377–382.

-E-

- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460–2461.

Eichorst SA, Strasser F, Woyke T, et al (2015) Advancements in the application of NanoSIMS and Raman microspectroscopy to investigate the activity of microbial cells in soils. *FEMS Microbiol Ecol* 91:fiv106.

Eickhorst T, Tippkötter R (2008) Detection of microorganisms in undisturbed soil by combining fluorescence in situ hybridization (FISH) and micropedological methods. *Soil Biol Biochem* 40:1284–1293.

Emery X (2001) *Géostatistique linéaire*.

Epelde L, Lanzén A, Blanco F, et al (2015) Adaptation of soil microbial community structure and function to chronic metal contamination at an abandoned Pb-Zn mine. *FEMS Microbiol Ecol* 91:1–11.

-F-

Fanget B, Devos O, Naffrechoux E (2002) Rôle des acides humiques dans le transfert du pyrène entre les minéraux argileux et l'eau. *Rev Sci Eau Journal Water Sci* 15:95–108.

Faucheux C, Lefebvre E, De Fouquet C, et al (2008) Characterisation of a hydrocarbon polluted soil by an intensive multi-scale sampling. pp 961–970

Felske A, Akkermans ADL, De Vos WM (1998) Quantification of 16S rRNAs in Complex Bacterial Communities by Multiple Competitive Reverse Transcription-PCR in Temperature Gradient Gel Electrophoresis Fingerprints. *Appl Environ Microbiol* 64:4581–4587.

Feris K, Hristova K, Gebreyesus B, et al (2004) A shallow BTEX and MTBE contaminated aquifer supports a diverse microbial community. *Microb Ecol* 48:589–600.

Fernández-Luqueño F, Valenzuela-Encinas C, Marsch R, et al (2011) Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenges: a review. *Environ Sci Pollut Res* 18:12–30.

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

Fierer N, Breitbart M, Nulton J, et al (2007b) Metagenomic and Small-Subunit rRNA Analyses Reveal the Genetic Diversity of Bacteria, Archaea, Fungi, and Viruses in Soil. *Appl Environ Microbiol* 73:7059–7066.

Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R, Jackson RB (2005) Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol* 71:4117–4120.

Fierer N, Jackson RB (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:626–631.

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

Fierer N, Strickland MS, Liptzin D, et al (2009) Global patterns in belowground communities. *Ecol Lett* 12:1238–1249.

Fismes J, Perrin-Ganier C, Empereur-Bissonnet P, Morel JL (2002) Soil-to-root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils. *J Environ Qual* 31:1649–1656.

-G-

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

Gao Y, Ren L, Ling W, et al (2010) Desorption of phenanthrene and pyrene in soils by root exudates. *Bioresour Technol* 101:1159–1165. doi: 10.1016/j.biortech.2009.09.062

Gao Y, Yuan X, Lin X, et al (2015) Low-molecular-weight organic acids enhance the release of bound PAH residues in soils. *Soil Tillage Res* 145:103–110. doi: 10.1016/j.still.2014.09.008

Gao Y, Zhu L (2004) Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere* 55:1169–1178.

Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2:113–118.

Gartler J;Wimmer B;Soja G;Reichenauer TG (2014) Effects of rapeseed oil on the rhizodegradation of polyaromatic hydrocarbons in contaminated soil. *Int J Phytoremediation* 16:671–683.

Gerhardt KE, Huang X-D, Glick BR, Greenberg BM (2009) Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Sci* 176:20–30. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.09.014

Geyer KM, Altrichter AE, Takacs-Vesbach CD, et al (2014) Bacterial community composition of divergent soil habitats in a polar desert. *FEMS Microbiol Ecol* 89:490–494. doi: 10.1111/1574-6941.12306

Gianfreda L, Rao MA (2004) Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microb Technol* 35:339–354.

Gibson DT, Mahadevan V, Jerina DM, et al (1975) Oxidation of the carcinogens benzo [a] pyrene and benzo [a] anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science* 189:295–297.

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

Giller KE, Witter E, Mcgrath SP (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol Biochem* 30:1389–1414.

- Gołębiewski M, Deja-Sikora E, Cichosz M, et al (2014a) 16S rDNA Pyrosequencing Analysis of Bacterial Community in Heavy Metals Polluted Soils. *Microb Ecol* 67:635–647. doi: 10.1007/s00248-013-0344-7
- Gołębiewski M, Deja-Sikora E, Cichosz M, et al (2014b) 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. *Microb Ecol* 67:635–647.
- Gottel NR, Castro HF, Kerley M, et al (2011) Distinct Microbial Communities within the Endosphere and Rhizosphere of *Populus deltoides* Roots across Contrasting Soil Types. *Appl Environ Microbiol* 77:5934–5944. doi: 10.1128/AEM.05255-11
- Gramss G, Voigt K-D, Kirsche B (1999) Oxidoreductase enzymes liberated by plant roots and their effects on soil humic material. *Chemosphere* 38:1481–1494.
- Gremion F, Chatzinotas A, Harms H (2003) Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environ Microbiol* 5:896–907. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00484.x
- Gremion F, Chatzinotas A, Kaufmann K, Von Sigler W, Harms H (2004) Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment. *FEMS Microbiol Ecol Wiley* 48:273–283.
- Grosser R, Warshawsky D, Vestal JR (1991) Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo [a] pyrene, and carbazole in soils. *Appl Environ Microbiol* 57:3462–3469.
- Gupta S, Pathak B, Fulekar MH (2015) Molecular approaches for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 14:241–269. doi: 10.1007/s11157-014-9353-3

-H-

- Habe H, Omori T (2003) Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:225–243.
- Haeseler F, Stieber M, Werner P, Frimmel F (1993) Ecotoxicological Aspects of Chemical Pre-Oxidation Combined with Subsequent Microbial degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-In: Arendt.
- Hafner S, Wiesenberg GB, Stolnikova E, et al (2014) Spatial distribution and turnover of root-derived carbon in alfalfa rhizosphere depending on top- and subsoil properties and mycorrhization. *Plant Soil* 380:101–115. doi: 10.1007/s11104-014-2059-z
- Haichar F el Z, Marol C, Berge O, et al (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J* 2:1221–1230.
- Haichar F, Santaella C, Heulin T, Achouak W (2014) Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biol Biochem* 77:69–80.

- Hannula SE, de Boer W, van Veen JA (2010) In situ dynamics of soil fungal communities under different genotypes of potato, including a genetically modified cultivar. *Soil Biol Biochem* 42:2211–2223. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.08.020
- Hanser O (2015) La matière organique dissoute issue de sols contaminés par des goudrons de houille: vers une meilleure compréhension de sa nature et de sa réactivité.
- Hanser O, Biache C, Boulangé M, et al (2015) Evolution of dissolved organic matter during abiotic oxidation of coal tar—comparison with contaminated soils under natural attenuation. *Environ Sci Pollut Res* 22:1431–1443.
- Haritash AK, Kaushik CP (2009) Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J Hazard Mater* 169:1–15. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.03.137
- Hertenberger G, Zampach P, Bachmann G (2002) Plant species affect the concentration of free sugars and free amino acids in different types of soil. *J Plant Nutr Soil Sci* 165:557–565.
- Hill AJ, Ghoshal S (2002) Micellar solubilization of naphthalene and phenanthrene from nonaqueous-phase liquids. *Environ Sci Technol* 36:3901–3907.
- Hiltner L (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb Dtsch Landwirtsch Ges* 98:59–78.
- Hinsinger P, Gobran GR, Gregory PJ, Wenzel WW (2005) Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol* 168:293–303. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01512.x
- Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant Soil* 248:43–59. doi: 10.1023/A:1022371130939
- Hong JW, Park JY, Gadd GM (2010) Pyrene degradation and copper and zinc uptake by *Fusarium solani* and *Hypocrea lixii* isolated from petrol station soil. *J Appl Microbiol* 108:2030–2040. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04613.x
- Huang WE, Stoecker K, Griffiths R, et al (2007) Raman- FISH: combining stable- isotope Raman spectroscopy and fluorescence in situ hybridization for the single cell analysis of identity and function. *Environ Microbiol* 9:1878–1889.
- Huang W, Peng P 'an, Yu Z, Fu J (2003) Effects of organic matter heterogeneity on sorption and desorption of organic contaminants by soils and sediments. *Appl Geochem* 18:955–972.
- Hybholt TK, Aamand J, Johnsen AR (2011) Quantification of centimeter-scale spatial variation in PAH, glucose and benzoic acid mineralization and soil organic matter in road-side soil. *Adapt For Ecosyst Air Pollut Clim Change* 159:1085–1091. doi: 10.1016/j.envpol.2011.02.028

- Jacques RJS, Okeke BC, Bento FM, et al (2008) Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresour Technol* 99:2637–2643. doi: 10.1016/j.biortech.2007.04.047
- Jangid K, Williams MA, Franzluebbers AJ, et al (2011) Land-use history has a stronger impact on soil microbial community composition than aboveground vegetation and soil properties. *Soil Biol Biochem* 43:2184–2193. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.06.022
- Janssen PH (2006) Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol* 72:1719–1728.
- Jin J, Wang G-H, Liu X-B, et al (2009) Temporal and Spatial Dynamics of Bacterial Community in the Rhizosphere of Soybean Genotypes Grown in a Black Soil. *Pedosphere* 19:808–816. doi: 10.1016/S1002-0160(09)60176-4
- Johnsen A, Karlson U (2004) Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:452–459.
- Johnsen AR, Styriehave B, Aamand J (2014) Quantification of small-scale variation in the size and composition of phenanthrene-degrader populations and PAH contaminants in traffic-impacted topsoil. *FEMS Microbiol Ecol* 88:84–93. doi: 10.1111/1574-6941.12272
- Johnsen AR, Wick LY, Harms H (2005) Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Pollut* 133:71–84.
- Joner EJ, Corgié SC, Amellal N, Leyval C (2002) Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 34:859–864. doi: 10.1016/S0038-0717(02)00018-4
- Joner EJ, Leyval C (2001) Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza* 10:155–159. doi: 10.1007/s005720000071
- Joner EJ, Leyval C (2003) Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environ Sci Technol* 37:2371–2375.
- Juck D, Charles T, Whyte L, Greer Cw (2000) Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiol Ecol* 33:241–249.
- Juhasz AL, Aloor S, Adetutu EM (2014) Predicting PAH bioremediation efficacy using bioaccessibility assessment tools: Validation of PAH biodegradation–bioaccessibility correlations. *Int Biodeterior Biodegrad* 95, Part B:320–329. doi: 10.1016/j.ibiod.2014.09.003

- Juhasz AL, Britz ML, Stanley GA (1997) Degradation of fluoranthene, pyrene, benz [a] anthracene and dibenz [a, h] anthracene by *Burkholderia cepacia*. *J Appl Microbiol* 83:189–198.
- Juhasz AL, Naidu R (2000) Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [a] pyrene. *Int Biodeterior Biodegrad* 45:57–88.
- Juhasz AL, Stanley GA, Britz ML (2000) Degradation of High Molecular Weight PAHs in Contaminated Soil by a Bacterial Consortium: Effects on Microtox and Mutagenicity Bioassays. *Bioremediation J* 4:271–283. doi: 10.1080/10889860091114248

-K-

- Kallimanis A, Frillingos S, Drainas C, Koukkou A (2007) Taxonomic identification, phenanthrene uptake activity, and membrane lipid alterations of the PAH degrading *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:709–717. doi: 10.1007/s00253-007-1036-3
- Kallimanis A, LaButti KM, Lapidus A, et al (2011) Complete genome sequence of *Arthrobacter phenanthrenivorans* type strain (Sphe3). *Stand Genomic Sci* 4:123–130. doi: 10.4056/sigs.1393494
- Kanally RA, Harayama S (2000) Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *J Bacteriol* 182:2059–2067.
- Kandeler F, Kampichler C, Horak O (1996) Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biol Fertil Soils* 23:299–306.
- Kästner M, Breuer-Jammali M, Mahro B (1994) Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl Microbiol Biotechnol* 41:267–273.
- Kawasaki A, Watson E, Kertesz M (2012) Indirect effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination on microbial communities in legume and grass rhizospheres. *Plant Soil* 358:169–182. doi: 10.1007/s11104-011-1089-z
- Keith LH, Telliard WA (1979) Priority pollutants I—a perspective view. *Environ Sci Technol* 13:416–423.
- Khan S, Hesham AE-L, Qing G, et al (2009) Biodegradation of pyrene and catabolic genes in contaminated soils cultivated with *Lolium multiflorum* L. *J Soils Sediments* 9:482–491.
- Kim S-J, Kweon O, Freeman JP, et al (2006) Molecular Cloning and Expression of Genes Encoding a Novel Dioxygenase Involved in Low- and High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl Environ Microbiol* 72:1045–1054.

- Kirk JL, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT (2005) The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environ Pollut* 133:455–465. doi: 10.1016/j.envpol.2004.06.002
- Klaubauf S, Inselsbacher E, Zechmeister-Boltenstern S, et al (2010) Molecular diversity of fungal communities in agricultural soils from Lower Austria. *Fungal Divers* 44:65–75. doi: 10.1007/s13225-010-0053-1
- Köberl M, Müller H, Ramadan EM, Berg G (2011a) Desert farming benefits from microbial potential in arid soils and promotes diversity and plant health. *PLoS One* 6:e24452–e24452.
- Koops H-P, Purkhold U, Pommerening-Röser A, et al (2006) The Lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. (eds) *The Prokaryotes*. Springer New York, pp 778–811
- Koske RE, Gemma JN (1989) A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol Res* 92:486–488. doi: 10.1016/S0953-7562(89)80195-9
- Kowalchuk GA, Buma D, de Boer W, et al (2002) Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:509–520. doi: 10.1023/A:1020565523615
- Kuiper I, Lagendijk EL, Bloemberg GV, Lugtenberg BJ (2004) Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 17:6–15.
- Kumar R, Pandey S, Pandey A (2006) Plant roots and carbon sequestration. *Curr Sci* 91:885–890.
- Kuzyakov Y, Blagodatskaya E (2015) Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biol Biochem* 83:184–199. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.01.025

-L-

- Labbé D;Margesin R;Schinner F;Whyte LG;Greer CW (2007) Comparative phylogenetic analysis of microbial communities in pristine and hydrocarbon-contaminated Alpine soils. *FEMS Microbiol Ecol Wiley* 59:466–475.
- Landesman WJ, Nelson DM, Fitzpatrick MC (2014) Soil properties and tree species drive beta-diversity of soil bacterial communities. *Soil Biol Biochem* 76:201–209. doi: 10.1016/j.soilbio.2014.05.025
- Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N (2009) Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Appl Environ Microbiol* 75:5111–5120.
- Lauber CL, Ramirez KS, Aanderud Z, et al (2013) Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. *ISME J* 7:1641–1650.

- Leroy MC, Legras M, Marcotte S, et al (2015) Assessment of PAH dissipation processes in large-scale outdoor mesocosms simulating vegetated road-side swales. *Sci Total Environ* 520:146–153. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.020
- Leyval C, Turnau K, Haselwandter K (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7:139–153. doi: 10.1007/s005720050174
- Li J-L, Chen B-H (2002) Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants. *Chem Eng Sci* 57:2825–2835.
- Li J, Lu Y, Jiao W, et al (2010) Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils of an industrial area of China: multivariate analyses and geostatistics. *Chem Ecol* 26:35–48. doi: 10.1080/02757540903468094
- Ling W, Dang H, Liu J (2013) In situ gradient distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated rhizosphere soil: a field study. *J Soils Sediments* 13:677–685.
- Ling W, Ren L, Gao Y, et al (2009) Impact of low-molecular-weight organic acids on the availability of phenanthrene and pyrene in soil. *Soil Biol Biochem* 41:2187–2195. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.08.003
- Ling W, Sun R, Gao X, et al (2015) Low- molecular- weight organic acids enhance desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Eur J Soil Sci* 66:339–347.
- Linton P, Shotbolt L, Thomas A (2007) Microbial Communities in Long-Term Heavy Metal Contaminated Ombrotrophic Peats. *Water Air Soil Pollut* 186:97–113. doi: 10.1007/s11270-007-9468-z
- Liste H-H, Alexander M (2000) Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere* 40:7–10. doi: 10.1016/S0045-6535(99)00216-7
- Liste H-H, Prutz I (2006) Plant performance, dioxygenase-expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil. *Chemosphere* 62:1411–1420. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.05.018
- Liu P, Zhu D, Zhang H, et al (2008) Sorption of polar and nonpolar aromatic compounds to four surface soils of eastern China. *Environ Pollut* 156:1053–1060. doi: 10.1016/j.envpol.2008.04.020
- Li X, Li P, Lin X, et al (2008) Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. *J Hazard Mater* 150:21–26. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.04.040
- Li X, Rui J, Mao Y, et al (2014a) Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biol Biochem* 68:392–401. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.10.017

- Li Y-C, Liu B-R, Li S-H, et al (2014b) Shift in abundance and structure of soil ammonia-oxidizing bacteria and archaea communities associated with four typical forest vegetations in subtropical region. *J Soils Sediments* 14:1577–1586. doi: 10.1007/s11368-014-0902-8
- Lladó S, Gràcia E, Solanas AM, Viñas M (2013) Fungal and bacterial microbial community assessment during bioremediation assays in an aged creosote-polluted soil. *Soil Biol Biochem* 67:114–123. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.08.010
- Louvel B, Cébron A, Leyval C (2011) Root exudates affect phenanthrene biodegradation, bacterial community and functional gene expression in sand microcosms. *Int Biodeterior Biodegrad* 65:947–953. doi: 10.1016/j.ibiod.2011.07.003
- Lueders T, Wagner B, Claus P, Friedrich MW (2004) Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environ Microbiol* 6:60–72. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00535.x
- Lundstedt S, Persson Y, Öberg L (2006) Transformation of PAHs during ethanol-Fenton treatment of an aged gasworks' soil. *Chemosphere* 65:1288–1294.
- Lundstedt S, White PA, Lemieux CL, et al (2007) Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated sites. *AMBIO J Hum Environ* 36:475–485.
- Luo J, Zhuang W-Y (2010) New species and new Chinese records of Bionectriaceae (Hypocreales, Ascomycota). *Mycol Prog* 9:17–25.
- Luo L, Lin S, Huang H, Zhang S (2012) Relationships between aging of PAHs and soil properties. *Environ Pollut* 170:177–182. doi: 10.1016/j.envpol.2012.07.003

-M-

- Ma B, Lyu X, Zha T, et al (2015) Reconstructed metagenomes reveal changes of microbial functional profiling during PAHs degradation along a rice (*Oryza sativa*) rhizosphere gradient. *J Appl Microbiol* 118:890–900.
- Ma B, Wang J, Xu M, et al (2012a) Evaluation of dissipation gradients of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice rhizosphere utilizing a sequential extraction procedure. *Environ Pollut* 162:413–421.
- Mackay D, Shiu WY, Ma KC (1992) Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Volume II: polynuclear aromatic hydrocarbons, polychlorinated dioxins, and dibenzofurans.
- Mahaffey W, Gibson D, Cerniglia C (1988) Bacterial oxidation of chemical carcinogens: formation of polycyclic aromatic acids from benz [a] anthracene. *Appl Environ Microbiol* 54:2415–2423.

- Ma L, Zhang J, Han L, et al (2012b) The effects of aging time on the fraction distribution and bioavailability of PAH. *Chemosphere* 86:1072–1078. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.11.065
- Marilley L, Aragno M (1999) Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Appl Soil Ecol* 13:127–136. doi: 10.1016/S0929-1393(99)00028-1
- Marschner B (1999) Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) in soil. *J Plant Nutr Soil Sci* 162:1–14.
- Marschner H (1995) Functions of mineral nutrients: macronutrients. *Miner Nutr High Plants* 2:379–396.
- Marschner H, Römheld V, Kissel M (1987) Localization of phytosiderophore release and of iron uptake along intact barley roots. *Physiol Plant* 71:157–162.
- Marschner P, Yang C-H, Lieberei R, Crowley D. (2001) Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 33:1437–1445. doi: 10.1016/S0038-0717(01)00052-9
- McBratney A, Webster R (1986) Choosing functions for semi- variograms of soil properties and fitting them to sampling estimates. *J Soil Sci* 37:617–639.
- McCaig AE, Glover LA, Prosser JI (1999) Molecular Analysis of Bacterial Community Structure and Diversity in Unimproved and Improved Upland Grass Pastures. *Appl Environ Microbiol* 65:1721–1730.
- McCully M, Canny M (1985) Localisation of translocated ¹⁴C in roots and root exudates of field- grown maize. *Physiol Plant* 65:380–392.
- McDonald D, Price MN, Goodrich J, et al (2012) An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J* 6:610–618.
- McDougall BM, Rovira A (1970) Sites of exudation of ¹⁴c labelled compounds from wheat roots. *New Phytol* 69:999–1003.
- McNear Jr D (2013) The rhizosphere-roots, soil and everything in between.
- Militon C, Boucher D, Vachelard C, et al (2010) Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil. *FEMS Microbiol Ecol* 74:669–681. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00982.x
- Monard C, Martin-Laurent F, Lima O, et al (2013) Estimating the biodegradation of pesticide in soils by monitoring pesticide-degrading gene expression. *Biodegradation* 24:203–213.
- Moore JC, William Hunt H (1988) Resource compartmentation and the stability of real ecosystems. *Nature* 333:261–263.

- Mouhamadou B, Puissant J, Personeni E, et al (2013) Effects of two grass species on the composition of soil fungal communities. *Biol Fertil Soils* 49:1131–1139. doi: 10.1007/s00374-013-0810-x
- Mueller JG, Chapman P, Pritchard P (1989) Action of a fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. *Appl Environ Microbiol* 55:3085–3090.
- Mukherjee S, Juottonen H, Siivonen P, et al (2014) Spatial patterns of microbial diversity and activity in an aged creosote-contaminated site. *ISME J* 8:2131–2142.
- Müller S, Totsche KU, Kögel-Knabner I (2007) Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to mineral surfaces. *Eur J Soil Sci* 58:918–931. doi: 10.1111/j.1365-2389.2007.00930.x
- Muratova AY, Turkovskaya OV, Hübner T, Kusch P (2003) Studies of the Efficacy of Alfalfa and Reed in the Phytoremediation of Hydrocarbon-Polluted Soil. *Appl Biochem Microbiol* 39:599–605. doi: 10.1023/A:1026238720268

-N-

- Nacke H, Thürmer A, Wollherr A, et al (2011) Pyrosequencing-Based Assessment of Bacterial Community Structure Along Different Management Types in German Forest and Grassland Soils. *PLoS ONE* 6:e17000. doi: 10.1371/journal.pone.0017000
- Naidu R, Semple KT, Megharaj M, et al (2008) Bioavailability: Definition, assessment and implications for risk assessment. *Dev Soil Sci* 32:39–51.
- Nakagawa S, Cuthill IC (2007) Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biol Rev* 82:591–605.
- Nguyen C (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agron-Sci Prod Veg Environ* 23:375–396.
- Nilsson RH, Veldre V, Hartmann M, et al (2010) An open source software package for automated extraction of ITS1 and ITS2 from fungal ITS sequences for use in high-throughput community assays and molecular ecology. *Fungal Ecol* 3:284–287. doi: 10.1016/j.funeco.2010.05.002
- Northcott GL, Jones KC (2001) Partitioning, extractability, and formation of nonextractable PAH residues in soil. 2. Effects on compound dissolution behavior. *Environ Sci Technol* 35:1111–1117.
- Nunan N, Wu K, Young I, et al (2002) In situ spatial patterns of soil bacterial populations, mapped at multiple scales, in an arable soil. *Microb Ecol* 44:296–305.

-O-

- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, et al (2013) Package “vegan.” R Packag Ver 254:20–8.
- Oliveira V, Gomes N, Almeida A, et al (2014a) Hydrocarbon contamination and plant species determine the phylogenetic and functional diversity of endophytic degrading bacteria. *Mol Ecol* 23:1392–1404.
- Oliveira V, Gomes NCM, Almeida A, et al (2014b) Hydrocarbon contamination and plant species determine the phylogenetic and functional diversity of endophytic degrading bacteria. *Mol Ecol* 23:1392–1404. doi: 10.1111/mec.12559
- Olson PE, Castro A, Joern M, et al (2007) Comparison of plant families in a greenhouse phytoremediation study on an aged polycyclic aromatic hydrocarbon–contaminated soil. *J Environ Qual* 36:1461–1469.
- Ortet P, Barakat M, Lalaouna D, et al (2011) Complete Genome Sequence of a Beneficial Plant Root-Associated Bacterium, *Pseudomonas brassicacearum*. *J Bacteriol* 193:3146–3146. doi: 10.1128/JB.00411-11
- Ouvrard S, Barnier C, Bauda P, et al (2011) In Situ Assessment of Phytotechnologies for Multicontaminated Soil Management. *Int J Phytoremediation* 13:245–263. doi: 10.1080/15226514.2011.568546

-P-

- Pagé AP, Yergeau É, Greer CW (2015) *Salix purpurea* Stimulates the Expression of Specific Bacterial Xenobiotic Degradation Genes in a Soil Contaminated with Hydrocarbons. *PLoS ONE* 10:e0132062. doi: 10.1371/journal.pone.0132062
- Paissé S, Coulon F, Goñi-Urriza M, et al (2008) Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment. *FEMS Microbiol Ecol* 66:295–305. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00589.x
- Pandey J, Chauhan A, Jain RK (2009) Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation. *FEMS Microbiol Rev* 33:324–375. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00133.x
- Panov AV, Esikova TZ, Sokolov SL, et al (2013) Influence of soil pollution on the composition of a microbial community. *Microbiology* 82:241–248. doi: 10.1134/S0026261713010116
- Parks DH, Beiko RG (2010) Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics* 26:715–721.
- Pearson T, Rosenberg R (1978) Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Ocean Mar Biol Ann Rev* 16:229–311.

- Pedrosa FO, Monteiro RA, Wassem R, et al (2011) Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. *PLoS Genet* 7:e1002064. doi: 10.1371/journal.pgen.1002064
- Pegg GF, Parry DW (1983) Infection of lucerne (*Medicago sativa*) by *Fusarium* species. *Ann Appl Biol* 103:45–55. doi: 10.1111/j.1744-7348.1983.tb02739.x
- Peiffer JA, Spor A, Koren O, et al (2013) Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc Natl Acad Sci* 110:6548–6553.
- Peng A, Liu J, Ling W, et al (2015) Diversity and distribution of 16S rRNA and phenol monooxygenase genes in the rhizosphere and endophytic bacteria isolated from PAH-contaminated sites. *Sci Rep* 5:12173.
- Peng R-H, Xiong A-S, Xue Y, et al (2008) Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev* 32:927–955.
- Phillips LA, Germida JJ, Farrell RE, Greer CW (2008) Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. *Soil Biol Biochem* 40:3054–3064.
- Phillips LA, Greer CW, Farrell RE, Germida JJ (2012) Plant root exudates impact the hydrocarbon degradation potential of a weathered-hydrocarbon contaminated soil. *Appl Soil Ecol* 52:56–64. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.10.009
- Phillips TM, Liu D, Seech AG, et al (2000) Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests. *J Ind Microbiol Biotechnol* 24:132–139. doi: 10.1038/sj.jim.2900789
- Pielou EC (1966) The measurement of diversity in different types of biological collections. *J Theor Biol* 13:131–144.
- Poirel J, Joulian C, Leyval C, Billard P (2013) Arsenite-induced changes in abundance and expression of arsenite transporter and arsenite oxidase genes of a soil microbial community. *Res Microbiol* 164:457–465.
- Puglisi E, Pascazio S, Suci N, et al (2013) Rhizosphere microbial diversity as influenced by humic substance amendments and chemical composition of rhizodeposits. *Mol Asp Humic Subst Biol Funct Soil Ecosyst* 129:82–94. doi: 10.1016/j.gexplo.2012.10.006

-R-

- Rahman MH, Saiga S (2007) Endophyte Effects on Nutrient Acquisition in Tall Fescue Grown in Andisols. *J Plant Nutr* 30:2141–2158. doi: 10.1080/01904160701700632
- Ranjard L, Lignier L, Chaussod R (2006) Cumulative Effects of Short-Term Polymetal Contamination on Soil Bacterial Community Structure. *Appl Environ Microbiol* 72:1684–1687. doi: 10.1128/AEM.72.2.1684-1687.2006

- Ranjard L, Poly F, Combrisson J, et al (2000) Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microb Ecol* 39:263–272.
- Rasche F, Knapp D, Kaiser C, et al (2011) Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. *ISME J* 5:389–402.
- Reid BJ, Stokes JD, Jones KC, Semple KT (2000) Nonexhaustive cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability. *Environ Sci Technol* 34:3174–3179.
- Reyes-César A, Absalón Á, Fernández F, et al (2014) Biodegradation of a mixture of PAHs by non-ligninolytic fungal strains isolated from crude oil-contaminated soil. *World J Microbiol Biotechnol* 30:999–1009. doi: 10.1007/s11274-013-1518-7
- Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, et al (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J* 1:283–290.
- Rollin C, Quiot F, Denys S, Bureau J (2005) Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques. Guide méthodologique. Acquisition des données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines. INERIS–DRC–66244/DESP–R01
- Rousk J, Baath E, Brookes PC, et al (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J* 4:1340–1351.
- Rovira AD (1969) Plant root exudates. *Bot Rev* 35:35–57.
- Rudolph N, Esser HG, Carminati A, et al (2012) Dynamic oxygen mapping in the root zone by fluorescence dye imaging combined with neutron radiography. *J Soils Sediments* 12:63–74.

-S-

- Saison C, Degrange V, Oliver R, et al (2006) Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environ Microbiol* 8:247–257.
- Sandrin TR, Maier RM (2003) Impact of Metals on the Biodegradation of Organic Pollutants. *Environ Health Perspect* 111:1093.
- Sawulski P, Boots B, Clipson N, Doyle E (2015) Differential degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures by indigenous microbial assemblages in soil. *Lett Appl Microbiol* 61:199–207.
- Sawulski P, Clipson N, Doyle E (2014) Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on microbial community structure and PAH ring hydroxylating dioxygenase gene abundance in soil. *Biodegradation* 25:835–847. doi: 10.1007/s10532-014-9703-4

- Schimel J, Balsler TC, Wallenstein M (2007) Microbial Stress-Response Physiology and Its Implications for Ecosystem Function. *Ecology* 88:1386–1394. doi: 10.2307/27651246
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al (2009) Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541.
- Schüßler A, Walker C (2010) The Glomeromycota: a species list with new families and new genera.
- Selesi D, Jehmlich N, von Bergen M, et al (2010) Combined genomic and proteomic approaches identify gene clusters involved in anaerobic 2-methylnaphthalene degradation in the sulfate-reducing enrichment culture N47. *J Bacteriol* 192:295–306.
- Semple KT, Morriss A, Paton G (2003) Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *Eur J Soil Sci* 54:809–818.
- Shahsavari E, Adetutu E, Anderson P, Ball A (2013) Tolerance of Selected Plant Species to Petrogenic Hydrocarbons and Effect of Plant Rhizosphere on the Microbial Removal of Hydrocarbons in Contaminated Soil. *Water Air Soil Pollut* 224:1–14. doi: 10.1007/s11270-013-1495-3
- Shann JR, Boyle J (1994) Influence of plant species on in situ rhizosphere degradation.
- Shannon CE, Weaver W (1963) University of Illinois Press.
- Shi L-L, Mortimer PE, Slik JF, et al (2014) Variation in forest soil fungal diversity along a latitudinal gradient. *Fungal Divers* 64:305–315.
- Siciliano SD, Germida JJ (1998) Biolog analysis and fatty acid methyl ester profiles indicate that pseudomonad inoculants that promote phytoremediation alter the root-associated microbial community of *Bromus biebersteinii*. *Soil Biol Biochem* 30:1717–1723.
- Siciliano SD, Germida JJ, Banks K, Greer CW (2003) Changes in Microbial Community Composition and Function during a Polyaromatic Hydrocarbon Phytoremediation Field Trial. *Appl Environ Microbiol* 69:483–489.
- Simpson E (1949) Measurement of Diversity *Nature* 163. •.
- Singer AC, Crowley DE, Thompson IP (2003) Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *TRENDS Biotechnol* 21:123–130.
- Singleton D, Jones M, Richardson S, Aitken M (2013) Pyrosequence analyses of bacterial communities during simulated in situ bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:8381–8391. doi: 10.1007/s00253-012-4531-0
- Sipila TP, Keskinen A-K, Akerman M-L, et al (2008) High aromatic ring-cleavage diversity in birch rhizosphere: PAH treatment-specific changes of I.E.3 group extradiol dioxygenases and 16S rRNA bacterial communities in soil. *ISME J* 2:968–981.

- Smalla K, Wieland G, Buchner A, et al (2001) Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-Dependent Enrichment and Seasonal Shifts Revealed. *Appl Environ Microbiol* 67:4742–4751.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, et al (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *Proc Natl Acad Sci* 103:12115–12120.
- Soleimani M, Afyuni M, Hajabbasi MA, et al (2010) Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere* 81:1084–1090.
- Somtrakoon K, Chouychai W, Lee H (2014) Comparing anthracene and fluorene degradation in anthracene and fluorene-contaminated soil by single and mixed plant cultivation. *Int J Phytoremediation* 16:415–428.
- Spohn M, Carminati A, Kuzyakov Y (2013) Soil zymography—a novel in situ method for mapping distribution of enzyme activity in soil. *Soil Biol Biochem* 58:275–280.
- Stengel P, Gelin S (1998) *Sol: interface fragile*. Editions Quae.
- Stienstra AW, Klein Gunnewiek P, Laanbroek HJ (1994) Repression of nitrification in soils under a climax grassland vegetation. *FEMS Microbiol Ecol* 14:45–52. doi: 10.1111/j.1574-6941.1994.tb00089.x
- Storey S, Ashaari MM, McCabe G, et al (2014) Microbial community structure during fluoranthene degradation in the presence of plants. *J Appl Microbiol* 117:74–84. doi: 10.1111/jam.12518
- Styrishave B, Björklund E, Johnsen A, Halling-Sørensen B (2012) The Spatial Heterogeneity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil Depends on Their Physico-chemical Properties. *Water Air Soil Pollut* 223:969–977. doi: 10.1007/s11270-011-0916-4
- Suleiman AKA, Manoeli L, Boldo JT, et al (2013) Shifts in soil bacterial community after eight years of land-use change. *Syst Appl Microbiol* 36:137–144.
- Sun B, Ling W, Wang Y (2013) Can root exudate components influence the availability of pyrene in soil? *J Soils Sediments* 13:1161–1169. doi: 10.1007/s11368-013-0712-4
- Sun M, Fu D, Teng Y, et al (2011) In situ phytoremediation of PAH-contaminated soil by intercropping alfalfa (*Medicago sativa* L.) with tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and associated soil microbial activity. *J Soils Sediments* 11:980–989. doi: 10.1007/s11368-011-0382-z
- Sun R, Belcher RW, Liang J, et al (2015) Effects of cowpea (*Vigna unguiculata*) root mucilage on microbial community response and capacity for phenanthrene remediation. *J Environ Sci* 33:45–59. doi: 10.1016/j.jes.2014.11.013
- Sutton NB, Maphosa F, Morillo JA, et al (2013) Impact of Long-Term Diesel Contamination on Soil Microbial Community Structure. *Appl Environ Microbiol* 79:619–630. doi: 10.1128/AEM.02747-12

- Tejeda-Agredano MC, Gallego S, Vila J, et al (2013) Influence of the sunflower rhizosphere on the biodegradation of PAHs in soil. *Soil Biol Biochem* 57:830–840. doi: 10.1016/j.soilbio.2012.08.008
- Thavamani P, Malik S, Beer M, et al (2012) Microbial activity and diversity in long-term mixed contaminated soils with respect to polyaromatic hydrocarbons and heavy metals. *J Environ Manage* 99:10–17.
- Thion C, Cébron A, Beguiristain T, Leyval C (2012a) Long-term in situ dynamics of the fungal communities in a multi-contaminated soil are mainly driven by plants. *FEMS Microbiol Ecol* 82:169–181. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01414.x
- Thion C, Cébron A, Beguiristain T, Leyval C (2012b) PAH biotransformation and sorption by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed co-cultures. *Int Biodeterior Biodegrad* 68:28–35. doi: 10.1016/j.ibiod.2011.10.012
- Thion C, Cébron A, Beguiristain T, Leyval C (2013) Inoculation of PAH-degrading strains of *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* in rhizospheric sand and soil microcosms: microbial interactions and PAH dissipation. *Biodegradation* 24:569–581. doi: 10.1007/s10532-013-9628-3
- Tian L, Ma P, Zhong J-J (2003a) Impact of the presence of salicylate or glucose on enzyme activity and phenanthrene degradation by *Pseudomonas mendocina*. *Process Biochem* 38:1125–1132. doi: 10.1016/S0032-9592(02)00245-5
- Tian L, Ma P, Zhong J-J (2003b) Impact of the presence of salicylate or glucose on enzyme activity and phenanthrene degradation by *Pseudomonas mendocina*. *Process Biochem* 38:1125–1132.
- Törneman N, Yang X, Bååth E, Bengtsson G (2008) Spatial covariation of microbial community composition and polycyclic aromatic hydrocarbon concentration in a creosote- polluted soil. *Environ Toxicol Chem* 27:1039–1046.
- Torres-Cortés G, Millán V, Fernández-González A, et al (2012) Bacterial community in the rhizosphere of the cactus species *Mammillaria carnea* during dry and rainy seasons assessed by deep sequencing. *Plant Soil* 357:275–288.
- Trouvelot, Kough, Gianinazzi-Pearson A J.L, V. (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d 'un système racinaire. Recherche de méthodes d 'estimation ayant une signification fonctionnelle. 217–221.
- Tunega D, Gerzabek MH, Haberhauer G, et al (2009) Model study on sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to goethite. *J Colloid Interface Sci* 330:244–249. doi: 10.1016/j.jcis.2008.10.056
- Turner S, Pryer KM, Miao VP, Palmer JD (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis I. *J Eukaryot Microbiol* 46:327–338.

-U-

Uhlik O, Musilova L, Ridl J, et al (2013) Plant secondary metabolite-induced shifts in bacterial community structure and degradative ability in contaminated soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:9245–9256. doi: 10.1007/s00253-012-4627-6

-V-

Vančura V, Hovadik A (1965) Root exudates of plants: II. Composition of root exudates of some vegetables. *Plant Soil* 21–32.

Vila J, Tauler M, Grifoll M (2015) Bacterial PAH degradation in marine and terrestrial habitats. *Curr Opin Biotechnol* 33:95–102. doi: 10.1016/j.copbio.2015.01.006

Villanneau E, Saby NA, Orton T, et al (2013) First evidence of large-scale PAH trends in French soils. *Environ Chem Lett* 11:99–104. doi: 10.1007/s10311-013-0401-y

Vitte I, Duran R, Jézéquel R, et al (2011) Effect of oxic/anoxic switches on bacterial communities and PAH biodegradation in an oil-contaminated sludge. *Environ Sci Pollut Res* 18:1022–1032.

Vos M, Wolf AB, Jennings SJ, Kowalchuk GA (2013) Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. *FEMS Microbiol Rev* 37:936–954. doi: 10.1111/1574-6976.12023

-W-

Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol* 132:44–51.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261–5267.

Wang Z, Chen S, Xu Y, Tang J (2012) Aging effects on sorption–desorption behaviors of PAHs in different natural organic matters. *J Colloid Interface Sci* 382:117–122. doi: 10.1016/j.jcis.2012.06.003

Wei J, Liu X, Wang Q, et al (2014) Effect of rhizodeposition on pyrene bioaccessibility and microbial structure in pyrene and pyrene–lead polluted soil. *Chemosphere* 97:92–97. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.09.105

Wenzel W (2009) Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil* 321:385–408. doi: 10.1007/s11104-008-9686-1

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) 38 - Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, White JJSJ (eds) *PCR Protocols*. Academic Press, San Diego, pp 315–322

Wilcke W (2000) SYNOPSIS Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soil — a Review. *J Plant Nutr Soil Sci* 163:229–248. doi: 10.1002/1522-2624(200006)163:3<229::AID-JPLN229>3.0.CO;2-6

Will C, Thürmer A, Wollherr A, et al (2010) Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 76:6751–6759.

-X-

Xiao N, Liu R, Jin C, Dai Y (2015) Efficiency of five ornamental plant species in the phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecol Eng* 75:384–391. doi: 10.1016/j.ecoleng.2014.12.008

Xiong J, Liu Y, Lin X, et al (2012) Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau. *Environ Microbiol* 14:2457–2466.

Xu Y, Sun G-D, Jin J-H, et al (2014) Successful bioremediation of an aged and heavily contaminated soil using a microbial/plant combination strategy. *J Hazard Mater* 264:430–438. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.10.071

-Y-

Yang C-H, Crowley DE (2000) Rhizosphere Microbial Community Structure in Relation to Root Location and Plant Iron Nutritional Status. *Appl Environ Microbiol* 66:345–351. doi: 10.1128/AEM.66.1.345-351.2000

Yang S, Wen X, Zhao L, et al (2014a) Crude Oil Treatment Leads to Shift of Bacterial Communities in Soils from the Deep Active Layer and Upper Permafrost along the China-Russia Crude Oil Pipeline Route. *PLoS ONE* 9:e96552. doi: 10.1371/journal.pone.0096552

Yang S, Wen X, Zhao L, et al (2014b) Crude oil treatment leads to shift of bacterial communities in soils from the deep active layer and upper permafrost along the China-Russia Crude Oil Pipeline route.

Yang Y, Campbell CD, Clark L, et al (2006) Microbial indicators of heavy metal contamination in urban and rural soils. *Chemosphere* 63:1942–1952. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.10.009

Yang Y, Wang J, Liao J, et al (2014c) Distribution of Naphthalene Dioxygenase Genes in Crude Oil-Contaminated Soils. *Microb Ecol* 68:785–793. doi: 10.1007/s00248-014-0457-7

Yang Y, Wu L, Lin Q, et al (2013) Responses of the functional structure of soil microbial community to livestock grazing in the Tibetan alpine grassland. *Glob Change Biol* 19:637–648.

Yergeau E, Bokhorst S, Kang S, et al (2012) Shifts in soil microorganisms in response to warming are consistent across a range of Antarctic environments. *ISME J* 6:692–702.

Yergeau E, Sanschagrín S, Maynard C, et al (2014) Microbial expression profiles in the rhizosphere of willows depend on soil contamination. *ISME J* 8:344–358.

-Z-

Zhang X, Zhao L, Xu S, et al (2013a) Soil moisture effect on bacterial and fungal community in Beilu River (Tibetan Plateau) permafrost soils with different vegetation types. *J Appl Microbiol* 114:1054–1065.

Zhang Z, Zhao X, Liang Y, et al (2013b) Microbial functional genes reveal selection of microbial community by PAHs in polluted soils. *Environ Chem Lett* 11:11–17. doi: 10.1007/s10311-012-0370-6

Zhou H, Wong AY, Yu RK, et al (2009) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Structural Shift of Bacterial Communities in Mangrove Sediment. *Microb Ecol* 58:153–160. doi: 10.1007/s00248-008-9456-x

Zhou W, Yang J, Lou L, Zhu L (2011) Solubilization properties of polycyclic aromatic hydrocarbons by saponin, a plant-derived biosurfactant. *Environ Pollut* 159:1198–1204.

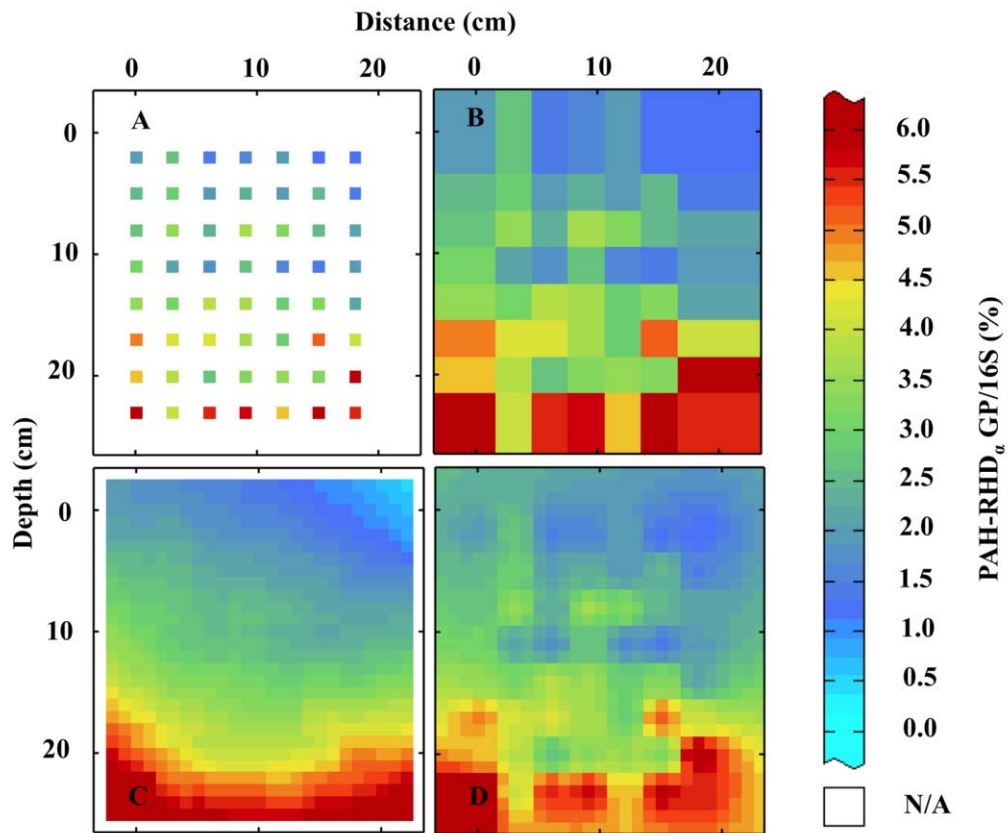
Annexes

Annexes chapitre 3

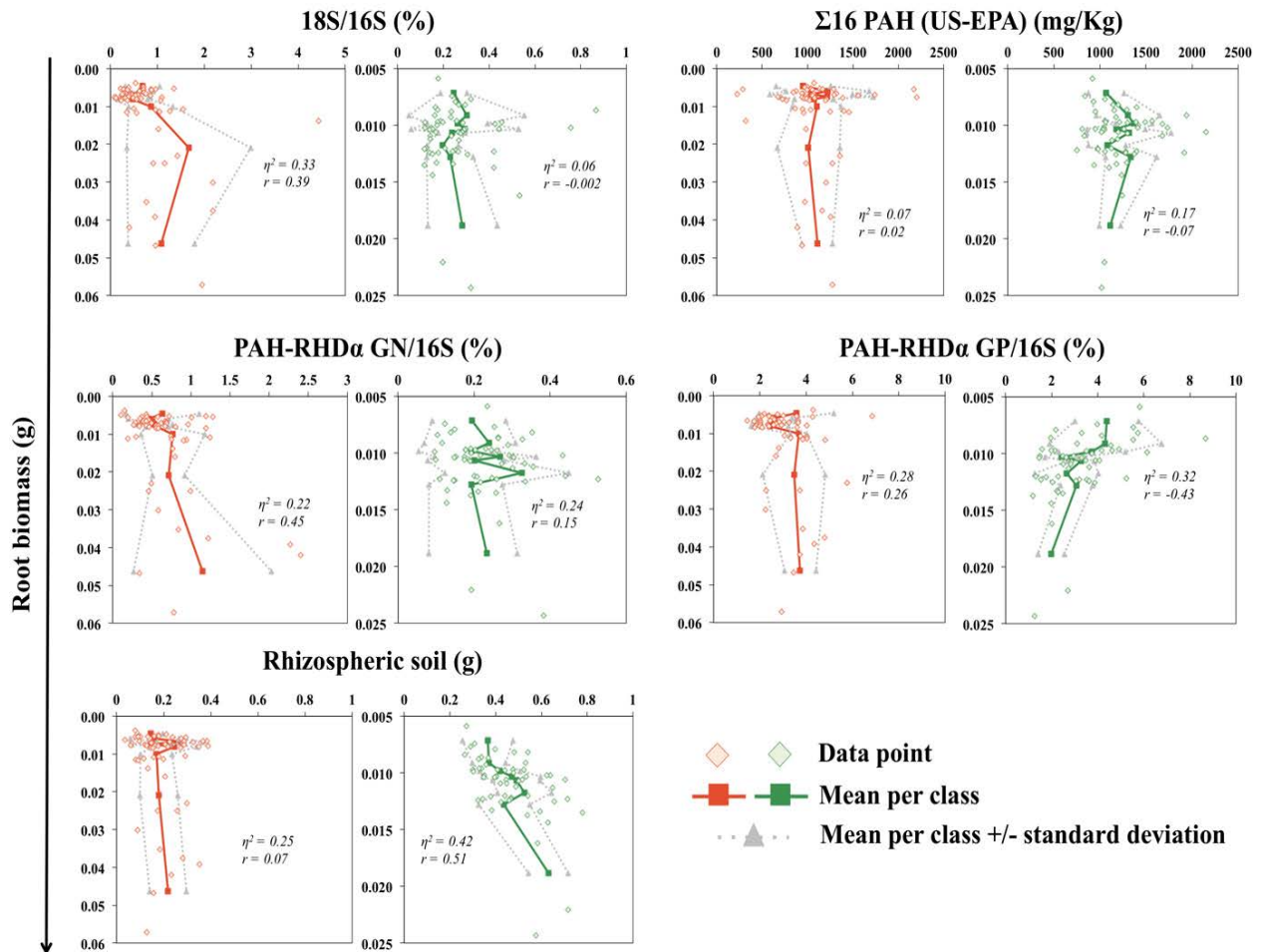
Annexe 3. 1. Pearson's correlation matrix between soil properties. Values in bold correspond to significant correlation between variables ($p < 0.05$).

Variables	Depth	%18S_alf	%18S_Rye	% PAH-RHD _a GN_Alf	% PAH-RHD _a GN_Rye	% PAH-RHD _a GP_Alf	% PAH-RHD _a GP_Rye	Root biomass_Alf	Root biomass_Rye	Rhizo. soil_Alf	Rhizo. soil_Rye	16 PAH_Alf	16 PAH_Rye	2-3 rings PAH_Alf	2-3 rings PAH_Rye	4 rings PAH_Alf	4 rings PAH_Rye	5-6 rings PAH_Alf	5-6 rings PAH_Rye
Depth	1	-0,215	-0,326	-0,168	-0,298	0,121	0,537	-0,636	-0,529	0,286	-0,517	-0,032	-0,057	-0,087	-0,139	-0,018	-0,058	0,007	0,001
%18S_alf	-0,215	1	-0,183	0,523	-0,446	0,245	-0,260	0,384	0,188	-0,186	0,167	-0,113	0,011	-0,037	0,111	-0,089	-0,002	-0,157	-0,009
%18S_Rye	-0,326	-0,183	1	-0,194	0,268	-0,149	-0,014	0,199	0,194	0,115	0,349	-0,031	0,000	-0,063	0,003	-0,027	0,010	-0,001	-0,019
% PAH-RHD _a GN_Alf	-0,168	0,523	-0,194	1	-0,363	0,150	-0,200	0,344	0,041	-0,122	-0,022	0,020	-0,021	0,026	-0,006	0,002	-0,032	0,025	-0,003
% PAH-RHD _a GN_Rye	-0,298	-0,446	0,268	-0,363	1	-0,142	0,059	0,185	0,078	0,089	0,077	-0,102	0,003	-0,087	0,014	-0,129	-0,001	-0,062	-0,005
% PAH-RHD _a GP_Alf	0,121	0,245	-0,149	0,150	-0,142	1	-0,212	0,029	-0,183	0,170	0,045	-0,218	-0,091	-0,120	-0,104	-0,198	-0,123	-0,244	-0,037
% PAH-RHD _a GP_Rye	0,537	-0,260	-0,014	-0,200	0,059	-0,212	1	-0,322	-0,245	0,101	-0,308	-0,007	-0,091	-0,092	-0,210	0,018	-0,142	0,040	0,022
Root biomass_Alf	-0,636	0,384	0,199	0,344	0,185	0,029	-0,322	1	0,323	0,072	0,464	0,016	-0,073	-0,001	-0,040	-0,016	-0,090	0,051	-0,063
Root biomass_Rye	-0,529	0,188	0,194	0,041	0,078	-0,183	-0,245	0,323	1	-0,315	0,512	-0,053	-0,068	0,022	0,020	-0,043	-0,043	-0,103	-0,132
Rhizo. soil_Alf	0,286	-0,186	0,115	-0,122	0,089	0,170	0,101	0,072	-0,315	1	0,007	-0,141	0,124	-0,174	0,100	-0,123	0,120	-0,089	0,132
Rhizo. soil_Rye	-0,517	0,167	0,349	-0,022	0,077	0,045	-0,308	0,464	0,512	0,007	1	-0,024	-0,023	-0,021	0,034	0,003	-0,028	-0,040	-0,052
16 PAH_Alf	-0,032	-0,113	-0,031	0,020	-0,102	-0,218	-0,007	0,016	-0,053	-0,141	-0,024	1	0,114	0,760	0,012	0,928	0,131	0,945	0,131
16 PAH_Rye	-0,057	0,011	0,000	-0,021	0,003	-0,091	-0,091	-0,073	-0,068	0,124	-0,023	0,114	1	-0,032	0,917	0,196	0,976	0,125	0,951
2-3 rings PAH_Alf	-0,087	-0,037	-0,063	0,026	-0,087	-0,120	-0,092	-0,001	0,022	-0,174	-0,021	0,760	-0,032	1	-0,083	0,520	-0,012	0,548	-0,032
2-3 rings PAH_Rye	-0,139	0,111	0,003	-0,006	0,014	-0,104	-0,210	-0,040	0,020	0,100	0,034	0,012	0,917	-0,083	1	0,119	0,913	-0,007	0,779
4 rings PAH_Alf	-0,018	-0,089	-0,027	0,002	-0,129	-0,198	0,018	-0,016	-0,043	-0,123	0,003	0,928	0,196	0,520	0,119	1	0,198	0,904	0,208
4 rings PAH_Rye	-0,058	-0,002	0,010	-0,032	-0,001	-0,123	-0,142	-0,090	-0,043	0,120	-0,028	0,131	0,976	-0,012	0,913	0,198	1	0,146	0,880
5-6 rings PAH_Alf	0,007	-0,157	-0,001	0,025	-0,062	-0,244	0,040	0,051	-0,103	-0,089	-0,040	0,945	0,125	0,548	-0,007	0,904	0,146	1	0,154
5-6 rings PAH_Rye	0,001	-0,009	-0,019	-0,003	-0,005	-0,037	0,022	-0,063	-0,132	0,132	-0,052	0,131	0,951	-0,032	0,779	0,208	0,880	0,154	1

Annexe 3.2. Comparison of different mapping representations of the percentage of PAH-RHD_a GP relative to 16S rDNA variable for ryegrass. A: measured data point, B: data point estimated by nearest neighboring, C: kriging estimation, F: estimation by inverse distances, with 1/D³. N/A: non-available data.



Annexe 3. 3 Relationship between percentages of fungal communities (18S/16S), PAH-degrading bacterial communities (PAH-RHD α GN and GP/16S), the sum of 16 PAH concentrations, weight of rhizosphere soil and root biomass for alfalfa (orange) and ryegrass (green). Correlation clouds show the data from the 56 soil samples (diamonds). Mean values (n=7) per class (squares and full line) and class standard deviations (triangles and dotted line) are represented. For each relationship, the Spearman's correlation coefficient (r) and the non-linear correlation coefficient (η^2) were calculated.



Annexes chapitre 4

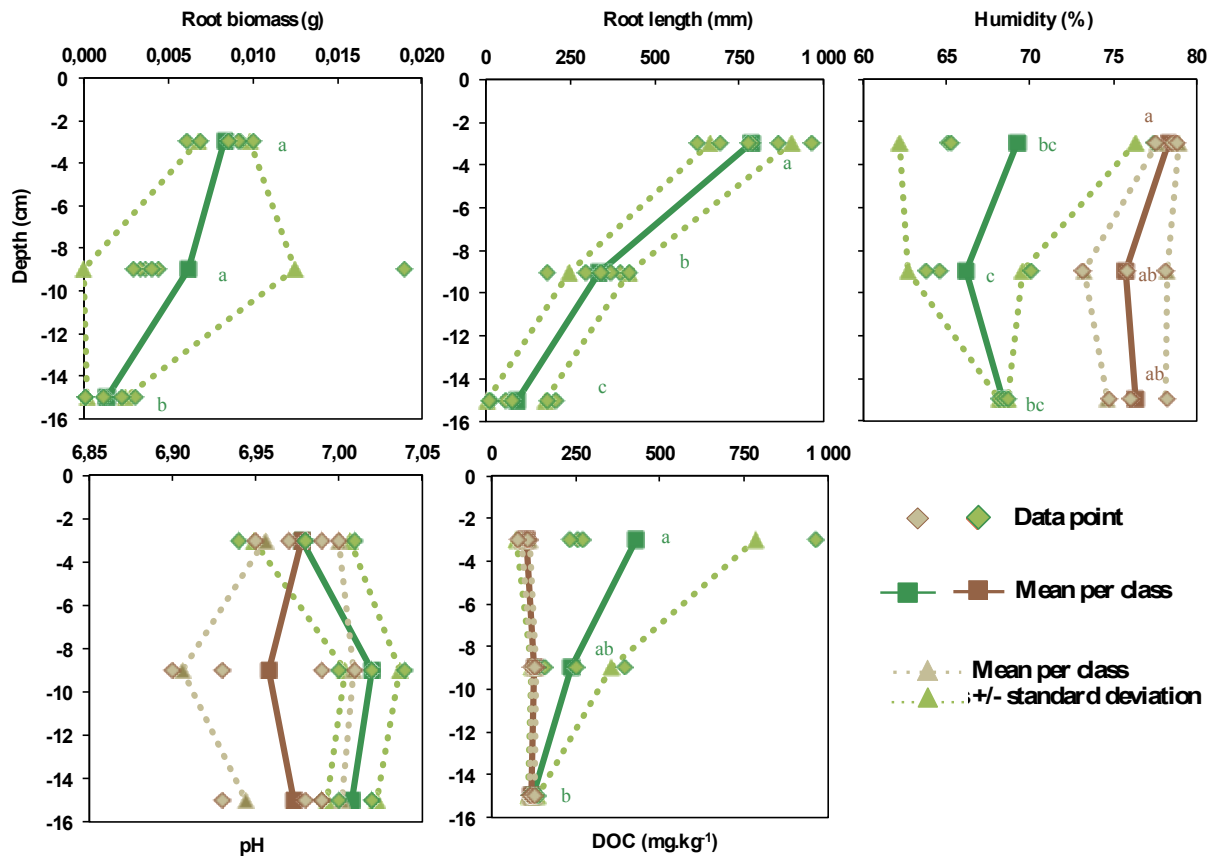
Annexe 4. 1. Summary of chemical, rhizosphere and bacterial soil characteristics from (Bourceret et al. submitted). Means \pm SD, (n=4 for pH, DOC, inositol, fructose and xylose values; and n=8 for PAH, root biomass, mass of rhizospheric soil and bacterial abundance). The effect of depth was tested separately for each plant species at 37 days using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparison test. The effect of plant species was evaluated using Student t-tests ($p < 0.05$). Different letters (A, B, C) denote groups with significantly different values ($p < 0.05$).

Conditions	Concentration (mg.kg ⁻¹)							Mass (g)		Bacterial abundance (copies.g ⁻¹ dw soil)
	pH	PAH	DOC	Inositol	Mannitol	Fructose	Xylose	Root biomass	Rhizospheric soil	16S
Alf_T37-2	6.91 ^B	1094	210.16	1.19 ^A	0.00	0.09	0.00	0.026 ^A	0.175 ^B	3.96.10 ⁹
Alf_T37-8	7.25 ^A	1042	145.85	0.32 ^B	1.45	0.10	0.00	0.011 ^B	0.140 ^B	3.31.10 ⁹
Alf_T37-14	7.34 ^A	1115	180.13	0.23 ^B	0.65	0.02	0.00	0.007 ^B	0.161 ^B	3.25.10 ⁹
Alf_T37-20	7.38 ^A	1047	222.78	0.82 ^{AB}	2.60	0.89	0.01	0.007 ^B	0.309 ^A	3.24.10 ⁹
Rye_T37-2	7.04 ^C	1267	115.70	0.16 ^{AB}	0.39 ^B	0.66 ^B	0.00	0.015 ^A	0.618 ^A	2.05.10 ⁹
Rye_T37-8	7.23 ^B	1248	113.19	0.07 ^B	2.84 ^A	1.44 ^{AB}	0.34	0.013 ^{ABC}	0.503 ^{AB}	2.44.10 ⁹
Rye_T37-14	7.32 ^{AB}	1358	123.06	0.24 ^A	4.73 ^A	2.48 ^A	0.20	0.011 ^{ABC}	0.446 ^B	2.61.10 ⁹
Rye_T37-20	7.40 ^A	1318	133.43	0.16 ^{AB}	4.33 ^A	1.93 ^{AB}	0.15	0.010 ^{BC}	0.425 ^B	2.40.10 ⁹
Plant effect	Alf = Rye	Alf < Rye	Alf > Rye	Alf > Rye	Alf < Rye	Alf < Rye	Alf < Rye	Alf = Rye	Alf < Rye	Alf > Rye

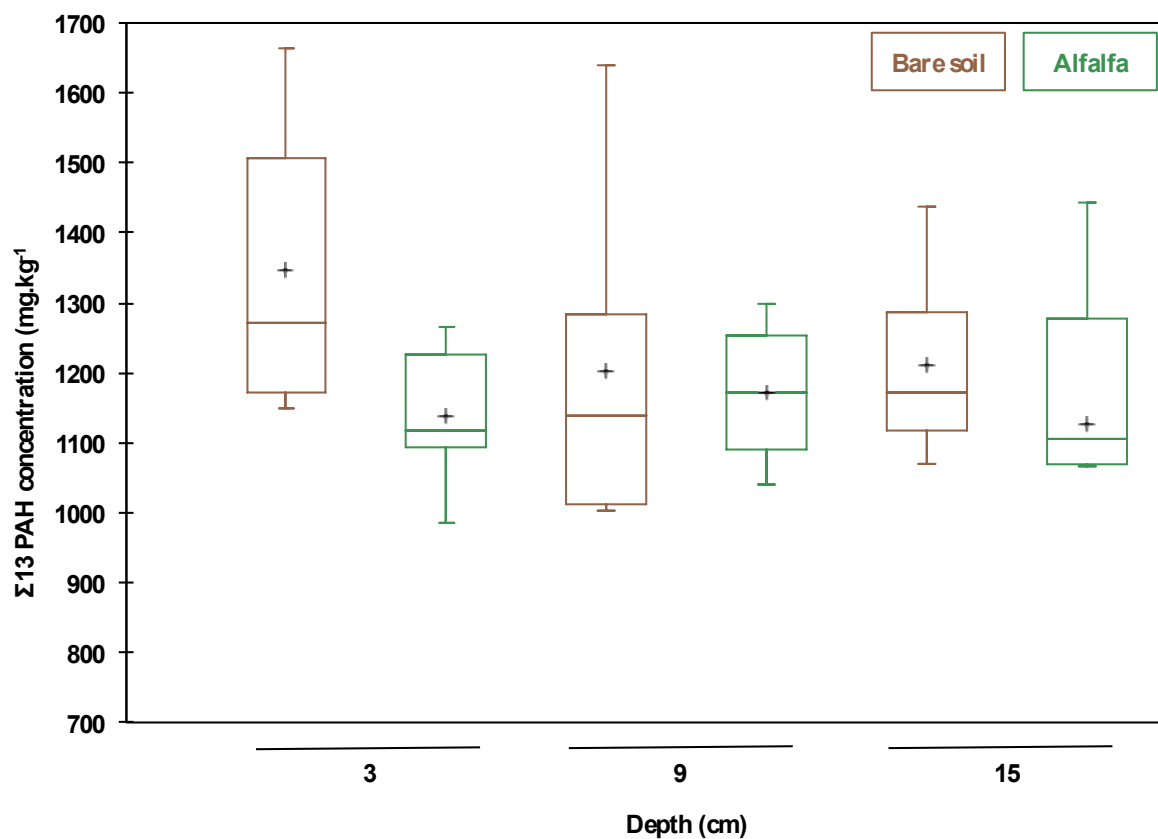
Annexes chapitre 5

Annexe 5. 1. Pearson's correlation matrix between soil properties according to time. Values in bold correspond to significant correlation between variables ($p < 0.05$).

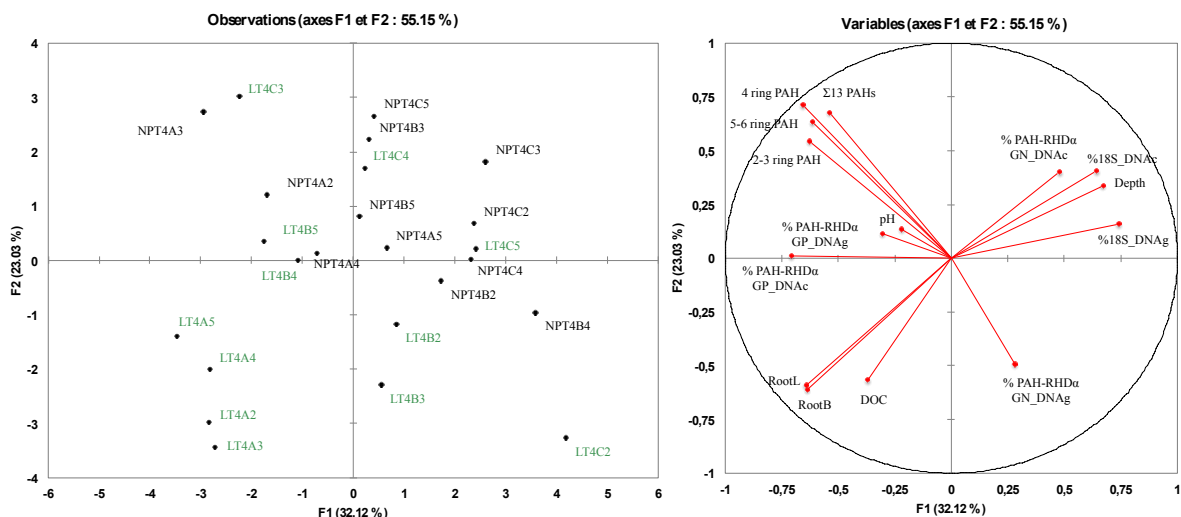
Variables	Time	%18S_DNAc	% PAH-RHD α GN_DNAc	% PAH-RHD α GP_DNAc	%18S_DNAg	% PAH-RHD α GN_DNAg	% PAH-RHD α GP_DNAg	2-3 ring PAH	4 ring PAH	5-6 ring PAH	Σ 13 PAHs	pH	DOC	RootB	RootL
Time	1	-0,646	0,106	0,733	-0,502	-0,032	0,497	-0,355	-0,269	0,042	-0,131	0,615	0,128	0,402	0,516
%18S_DNAc	-0,646	1	-0,373	-0,417	0,439	-0,441	-0,035	0,686	0,451	0,361	0,474	-0,603	-0,028	-0,360	-0,338
% PAH-RHD α GN_DNAc	0,106	-0,373	1	0,342	-0,263	0,485	0,021	-0,434	-0,391	-0,220	-0,339	0,059	-0,094	0,062	0,010
% PAH-RHD α GP_DNAc	0,733	-0,417	0,342	1	-0,532	-0,044	0,516	-0,204	-0,253	0,137	-0,053	0,409	0,154	0,452	0,538
%18S_DNAg	-0,502	0,439	-0,263	-0,532	1	0,075	-0,192	0,283	0,199	0,064	0,154	-0,386	-0,151	-0,363	-0,485
% PAH-RHD α GN_DNAg	-0,032	-0,441	0,485	-0,044	0,075	1	-0,199	-0,512	-0,448	-0,530	-0,547	0,213	-0,029	0,349	0,052
% PAH-RHD α GP_DNAg	0,497	-0,035	0,021	0,516	-0,192	-0,199	1	0,163	0,094	0,388	0,277	0,170	0,092	0,049	0,120
2-3 ring PAH	-0,355	0,686	-0,434	-0,204	0,283	-0,512	0,163	1	0,832	0,669	0,844	-0,521	0,105	-0,284	-0,156
4 ring PAH	-0,269	0,451	-0,391	-0,253	0,199	-0,448	0,094	0,832	1	0,689	0,903	-0,496	-0,006	-0,316	-0,190
5-6 ring PAH	0,042	0,361	-0,220	0,137	0,064	-0,530	0,388	0,669	0,689	1	0,930	-0,298	-0,055	-0,267	-0,135
Σ 13 PAHs	-0,131	0,474	-0,339	-0,053	0,154	-0,547	0,277	0,844	0,903	0,930	1	-0,437	-0,020	-0,316	-0,174
pH	0,615	-0,603	0,059	0,409	-0,386	0,213	0,170	-0,521	-0,496	-0,298	-0,437	1	0,016	0,317	0,287
DOC	0,128	-0,028	-0,094	0,154	-0,151	-0,029	0,092	0,105	-0,006	-0,055	-0,020	0,016	1	0,364	0,441
RootB	0,402	-0,360	0,062	0,452	-0,363	0,349	0,049	-0,284	-0,316	-0,267	-0,316	0,317	0,364	1	0,870
RootL	0,516	-0,338	0,010	0,538	-0,485	0,052	0,120	-0,156	-0,190	-0,135	-0,174	0,287	0,441	0,870	1



Annexe 5. 2. Root biomass and length, humidity and pH and dissolved organic carbon (DOC) as function of depth in alfalfa planted (green) and unplanted (brown) rhizotron after 22 days (T4). Correlation clouds show the data from the 18 (for root biomass), 9 (humidity) and 12 (pH and DOC) soil samples. Mean values ($n=6$ (root biomass), $n=3$ (humidity), $n=4$ (pH and DOC) per depth (squares and full line) and standard deviations (triangles and dotted lines) are represented. The effects of depth and presence of plant were evaluated by using two-way ANOVA ($p<0.05$). Different letters indicate significant differences between samples.

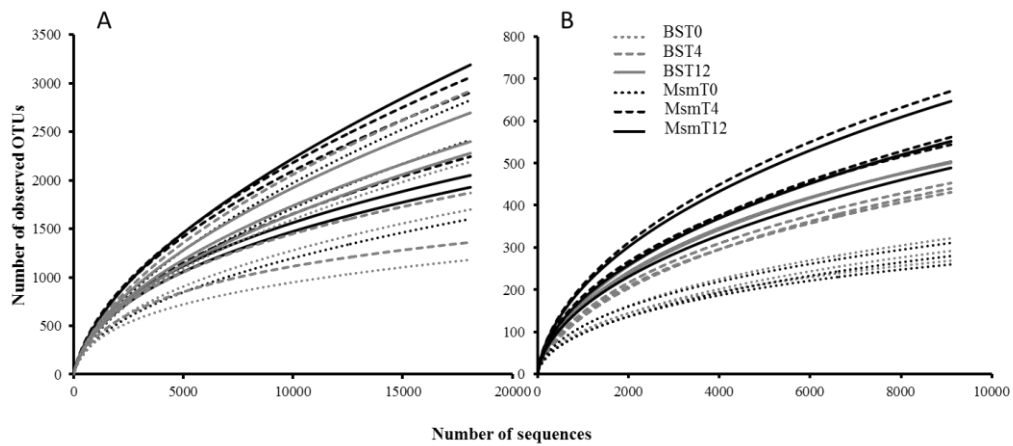


Annexe 5. 3. PAH concentration (sum of 13 US-EPA PAHs) in alfalfa planted (green) and unplanted (brown) soil at 3 (A), 9, (B) and 15 (C) cm depths in the rhizotrons after 22 days (T4). Box plots show means (black cross), n=6. The effects of depth and presence of plant were evaluated by using two-way ANOVA ($p < 0.05$).



Annexe 5. 5. Principal component analysis (PCA) and correlation circle generated using depth, DOC, pH, percentages (gene abundance relative to 16S rRNA gene abundance) of active (DNAc) and totale (DNAg) fungal (18S/16S) and PAH-degrading bacterial (% PAH-RHD_a GN and GP) communities, root biomass (RootB) and length (RootL), sum of 13 PAH concentrations, 2-3-ring PAHs (fluorene, phenanthrene, anthracene), 4-ring PAHs (fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chryzene), 5-6-ring PAHs (benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene) for the 12 samples (4 replicates per depth) from the alfalfa (L) (green) and bare soil (NP) (black) rhizotrons at 3 (A), 9, (B) and 15 (C) cm depths.

Annexes chapitre 6



Annexe 6. 1. Rarefaction curve representing the number of operational taxonomic units (OTUs) depending on the number of 16S rRNA genes (A) and ITS (B) sequences amplified from the six conditions. After OTU formation to 97% similarity, sub-sampling was performed to 18,100 and 9,100 sequences *per* sample for bacterial and fungal data respectively.

Annexe 6. 2. Affiliation at 97% similarity of the most abundant (>2% in at least one sample) bacterial and fungal OTUs in the six conditions (mean and standard deviation, n=3). Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Neuman-Keuls multiple comparison test to study the effect of plant cover and time on the most abundant bacterial (16S) and fungal (ITS) OTUs. Sections colored in dark grey / grey / light grey and white mean respectively that OTUs were significantly (p<0.05) favored at all time-points / favored at T4 / inhibited or not influenced by the plant cover or by time.

OTUs with relative abundance > 2%			Conditions						Impact of treatment		
No.	Phylum	Affiliation (97% similarity)	MsmT0	MsmT4	MsmT12	BST0	BST4	BST12	Time	Plant	
16S	OTU1	<i>Acidobacteria</i>	0.0±0.0	1.9±0.6	0.1±0.1	0.0±0.0	1.2±0.5	0.0±0.0			
	OTU2	<i>Actinobacteria</i>	0.2±0.1	2.7±0.7	1.9±0.5	0.1±0.1	0.3±0.2	0.5±0.1			
	OTU3	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Ohtaekwangia</i>	0.2±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.4±0.1	4.0±0.4	0.6±0.3		
	OTU4		<i>Ohtaekwangia</i>	0.1±0.1	0.7±0.1	1.1±0.1	0.2±0.1	0.4±0.1	2.1±0.7		
	OTU5	<i>Chloroflexi</i>	2.7±0.8	0.3±0.1	0.1±0.0	2.0±0.4	0.2±0.1	0.1±0.0			
	OTU6	<i>Firmicutes</i>	0.2±0.1	1.8±0.5	0.9±0.2	0.2±0.1	0.5±0.2	0.5±0.2			
	OTU7	<i>Gemmatimonadetes</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.7±0.2	3.7±0.1			
	OTU8	<i>Nitrospira</i>	0.1±0.1	0.4±0.1	5.2±0.5	0.4±0.2	1.8±0.2	5.7±0.8			
	OTU9	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Unclas. Erythrobacteraceae</i>	0.9±0.2	1.6±0.4	0.8±0.2	1.4±0.4	2.3±0.4	2.6±0.6		
	OTU10		<i>Unclas. Bradyrhizobiaceae</i>	0.7±0.1	1.0±0.2	2.8±0.6	0.8±0.2	1.0±0.3	1.7±0.1		
	OTU15	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Unclas. Burkholderiales</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.0	1.4±0.0	1.7±0.5		
	OTU14		<i>Unclas. Burkholderiaceae</i>	0.8±0.3	1.5±0.1	1.3±2.0	1.1±0.4	1.7±0.5	0.1±0.1		
	OTU11		<i>Thiobacillus</i>	16.0±2.6	2.8±0.3	0.7±0.2	14.2±2.6	3.8±0.7	0.3±0.1		
	OTU13		<i>Methyloversatilis</i>	0.1±0.1	0.6±0.1	2.4±0.4	0.2±0.0	1.3±0.3	2.1±0.4		
	OTU12		<i>Unclas. Rhodocyclaceae</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.8±0.2	0.0±0.0	0.5±0.2	2.2±0.3		
	OTU16		<i>Thermithobacillus</i>	1.9±0.5	0.2±0.1	0.0±0.0	1.6±0.3	0.2±0.0	0.0±0.0		
	OTU21		<i>Thiohalophilus</i>	2.0±0.1	0.5±0.3	0.6±0.2	1.8±0.6	1.5±0.3	1.4±0.4		
	OTU18		<i>Thiohalophilus</i>	0.0±0.0	0.6±0.2	1.7±0.4	0.1±0.0	1.5±0.4	1.4±0.4		
	OTU17		<i>Halothiobacillus</i>	2.0±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0	1.7±0.4	0.1±0.0	0.0±0.0		
	OTU19		<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Methylohalomonas</i>	1.2±0.1	0.3±0.2	0.0±0.0	1.6±0.6	1.5±1.6	0.1±0.0	
	OTU20	<i>Unclas. γ-Proteobacteria</i>		0.0±0.0	0.2±0.1	0.8±0.1	0.1±0.1	1.8±0.8	0.5±0.1		
	OTU23	<i>Dyella</i>	4.7±0.3	0.5±0.2	0.1±0.1	3.7±0.5	0.6±0.2	0.1±0.1			
OTU24	<i>Rhodanobacter</i>	2.7±0.3	1.0±0.1	0.2±0.2	2.9±0.2	0.5±0.2	0.1±0.0				
OTU22	<i>Unclas. Xanthomonadaceae</i>	2.2±0.2	0.6±0.2	0.0±0.0	1.8±0.1	0.3±0.1	0.0±0.0				
ITS	OTU1	<i>Phoma</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	8.1±4.2	0.6±0.3			
	OTU2	<i>Unclas. Pleosporales</i>	0.0±0.0	0.4±0.2	2.7±2.6	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0			
	OTU3	<i>Unclas. Pleosporales</i>	0.0±0.0	0.8±1.3	0.2±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0			
	OTU4	<i>Unclas. Pleosporales</i>	0.0±0.0	2.6±4.3	1.9±2.6	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0			
	OTU5	<i>Penicillium</i>	3.7±4.1	0.4±0.1	0.1±0.0	0.9±0.2	0.7±0.6	0.3±0.4			
	OTU6	<i>Talaromyces</i>	0.0±0.0	1.4±2.1	0.2±0.1	0.6±0.9	0.1±0.1	0.0±0.0			
	OTU7	<i>Talaromyces</i>	12.7±4.3	2.7±1.2	4.4±2.2	11.3±4.0	5.1±1.0	3.9±0.3			
	OTU8	<i>Unclas. Herpotrichiellaceae</i>	0.0±0.0	3.1±4.9	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0			
	OTU9	<i>Ascomycota</i>	<i>Acremonium</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	1.5±0.9	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0		
	OTU10		<i>Bionectria</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	1.6±1.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0		
	OTU11		<i>Emericellopsis</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.3	0.0±0.0	0.0±0.2	2.2±3.5		
	OTU12		<i>Fusarium</i>	0.1±0.1	0.5±0.3	2.5±1.8	0.0±0.0	0.0±0.0	0.3±0.3		
	OTU13		<i>Fusarium</i>	0.0±0.0	0.1±0.1	0.2±0.1	3.3±5.7	0.0±0.1	0.0±0.0		
	OTU14		<i>Haematonectria</i>	0.4±0.2	1.3±0.6	6.9±6.9	1.0±1.1	0.2±0.0	0.3±0.1		
	OTU15		<i>Pseudallescheria</i>	1.4±0.3	0.5±0.4	0.6±0.2	1.42±0.23	1.9±0.3	0.6±0.1		
	OTU16		<i>Scedosporium</i>	28.0±5.0	11.8±7.1	20.0±3.7	27.4±2.5	34.4±0.9	27.1±1.9		
	OTU17		<i>Unclas. Plectosphaerellaceae</i>	0.0±0.0	4.7±1.5	0.6±0.6	0.0±0.0	0.1±0.1	0.0±0.0		
	OTU18		<i>Coprinellus</i>	0.5±0.9	0.1±0.1	0.0±0.0	2.3±2.0	0.6±1.1	0.0±0.0		
	OTU19	<i>Basidiomycota</i>	<i>Unclas. Psathyrellaceae</i>	0.2±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	5.6±9.5	1.4±2.3	0.2±0.1		
	OTU20		<i>Unclas. Basidiomycota</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.4±0.3	0.0±0.0	0.4±0.7	4.3±0.9		
OTU21	<i>Unclas. fungi</i>	0.0±0.0	3.7±0.7	0.2±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0				
OTU22	<i>Unclas. fungi</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	1.1±0.9	0.0±0.0	0.0±0.0	0.5±0.2				
OTU23	<i>Unclas. fungi</i>	2.0±0.2	0.6±0.4	1.4±0.6	1.5±0.1	1.9±0.4	2.3±0.8				
OTU24	<i>Unclas. fungi</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.9±1.1				
OTU25	<i>Unclas. fungi</i>	0.0±0.0	6.3±5.6	1.3±1.3	0.0±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0				
OTU26	<i>Unclas. fungi</i>	0.0±0.0	4.4±3.0	0.2±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0				
OTU27	<i>Unclas. fungi</i>	0.0±0.0	4.2±2.9	0.4±0.1	0.0±0.0	0.1±0.1	0.0±0.0				
OTU28	<i>Unclas. fungi</i>	0.8±1.2	0.1±0.0	0.2±0.2	0.2±0.1	0.2±0.2	0.1±0.1				
OTU29	<i>Unclas. fungi</i>	<i>Unclas. fungi</i>	0.0±0.0	0.9±1.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0			
OTU30		<i>Unclas. fungi</i>	0.0±0.0	1.2±1.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0			
OTU31		<i>Unclas. fungi</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	1.2±0.5	0.0±0.0	0.3±0.3	10.4±8.6			
OTU32		<i>Unclas. fungi</i>	0.0±0.0	0.9±0.5	1.4±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0			
OTU33		<i>Unclas. fungi</i>	0.0±0.0	0.1±0.2	1.1±0.9	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.1			
OTU34		<i>Unclas. fungi</i>	18.6±7.8	6.2±3.2	8.8±1.5	16.7±2.9	11.6±1.3	9.3±2.3			
OTU35		<i>Unclas. fungi</i>	0.2±0.1	0.8±0.3	1.8±0.5	0.7±0.2	1.3±0.7	2.9±1.5			
OTU36		<i>Unclas. fungi</i>	0.0±0.0	4.6±3.6	0.9±0.5	0.0±0.0	0.1±0.0	0.0±0.1			
OTU37		<i>Unclas. fungi</i>	0.0±0.01	0.3±0.0	1.6±0.7	0.0±0.0	0.1±0.1	0.7±0.7			

Variabilité spatio-temporelle des HAP et des communautés microbiennes dans la rhizosphère d'un sol historiquement contaminé

Les Hydrocarbures Aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants organiques persistants, dont la faible disponibilité dans les sols historiquement contaminés limite leur biodégradation. La capacité des plantes à favoriser l'élimination de ces polluants par l'action des microorganismes associés à leur rhizosphère a été montrée (rhizodégradation). Toutefois les résultats sont variables, suggérant la variabilité spatio-temporelle des processus. Des études à différentes échelles de temps et d'espace, utilisant des microcosmes et des dispositifs *in situ* ont été menées pour préciser ces phénomènes. L'étude de la variabilité spatiale des HAP et de la diversité bactérienne a été menée au sein de deux rhizosphères contrastées (ray-grass et luzerne), à l'échelle centimétrique après 37 jours de culture sur un sol de friche industrielle. Les résultats ont montré une spatialisation de la teneur en sucre et du pH, de la diversité bactérienne et de l'abondance microbienne, spécifique de l'espèce végétale, mais sans structuration de la teneur en HAP. L'étude de la variabilité temporelle de ces processus a révélé la dissipation en 6 jours des polluants biodisponibles ainsi qu'un effet positif des plantes par rapport au sol nu sur la dissipation des HAP et sur l'expression des gènes de HAP-dioxygénase. Une étude à plus long terme (6 ans) et *in situ* a montré que le couvert végétal ralentit la dissipation des HAP et influencent fortement la diversité microbienne, tout comme certains paramètres édaphiques. L'ensemble de ces résultats montre l'importance de la biodisponibilité des HAP qui conditionne leur dissipation, et de la dynamique des communautés microbiennes dans la rhizosphère.

Mots clés : *Microorganismes, Rhizosphère, Sol, Diversité, HAP, Biodisponibilité, Variabilité spatio-temporelle*

Spatio-temporal variability of PAH and microbial community in the rhizosphere of aged-contaminated soil

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) are persistent organic pollutants in soil, whose degradation in aged-contaminated soil is limited by their low bioavailability. The ability of plants to promote pollutant dissipation through the action of rhizosphere microorganisms has been shown (rhizodegradation). However contrasted results were obtained suggesting spatio-temporal variability of processes. Different experiments, with different time and space scales, using microcosm and field trials were achieved to precise phenomena. Study of spatial variability of PAH and bacterial diversity were done in two-contrasted rhizospheres (ryegrass and alfalfa) at centimeter scale after 37 days of plant growth, on a wasteland aged contaminated soil. Results showed spatial structuration of sugar content, pH, bacterial diversity and microbial density, depending on plant species, but no vertical gradient was observed for PAH concentration. Study of temporal variability of processes showed dissipation of bioavailable fraction of pollutant in just 6 days and in comparison with bare soil, a positive impact of plant was shown on PAH dissipation and on expression of PAH dioxygenase genes. A long-term study (over 6 years) in a field trial revealed that plant cover slowed down PAH dissipation and impacted bacterial and fungal diversity as edaphic parameters. All these results underlined the importance of PAH bioavailability for the dissipation process and of spatio-temporal dynamic of microbial community, in the rhizosphere.

Key words: *Microorganisms, Rhizosphere, Soil, Diversity, PAH, Bioavailability, Spatio-temporal variability*